

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET

I

MEDICINSKI FAKULTET

Ante Rogošić

**RAZVOJ I VREDNOVANJE METODE ODREĐIVANJA GLUTATIONA U
FARMACEUTSKIM PRIPRAVCIMA SLIJEDNOM ANALIZOM INJEKTIRANJEM
UZ SPEKTROFOTOMETRIJSKI DETEKTOR**

Diplomski rad

Akadska godina: 2016./2017.

Mentor: doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun

Split, listopad 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Kemijsko-tehnološki i medicinski fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacija
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje: Farmacija
Nastavni predmet: Instrumentalne metode analize
Tema rada: je prihvaćena na sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor: doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun
Pomoć pri izradi: mag. ing. chem. ing. Maja Biočić

RAZVOJ I VREDNOVANJE METODE ODREĐIVANJA GLUTATIONA U FARMACEUTSKIM PRIPRAVCIMA SLIJEDNOM ANALIZOM INJEKTIRANJEM UZ SPEKTROFOTOMETRIJSKI DETEKTOR

Ante Rogošić, broj indeksa: 67

Sažetak:

U ovom je radu optimizirana i vrednovana metoda određivanja glutationa slijednom analizom injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor. Metoda se temelji na redoks-reakciji između bakar(II)-neokuproin kompleksa i glutationa (GSH). Glutacion ima ulogu reducenta te kao produkti nastaju oksidirani oblik glutationa (GSSG) i bakar(I)-neokuproin kompleks koji postiže apsorpcijski maksimum pri $\lambda = 458$ nm. Optimizacijom parametara protočnog sustava obuhvaćeni su redosljed injektiranja reagensa i uzorka, brzina protoka osnovne otopine, volumeni injektiranja analita i uzorka, duljina reakcijske uzvojnice te volumen petlje zadržavanja. Tako optimiziranom metodom ostvareno je linearno dinamičko područje (LDP) u koncentracijskom rasponu od $6,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ do $8,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ uz pripadajuću jednadžbu pravca $y = 3270 x - 0,0010$ i koeficijent linearne regresije $R^2 = 0,9983$. Izmjerene su vrijednosti poslužile kao temelj za računanje granice dokazivanja ($\text{LOD} = 2,20 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) i granice određivanja ($\text{LOQ} = 6,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$). U određivanju analita predloženom metodom interferirali su: limunska kiselina, vinska kiselina, acetilsalicilna kiselina te natrijev citrat. Temeljem 15 uzastopnih injektiranja standardne otopine uzorka utvrđena je ponovljivost metode uz relativno standardno odstupanje, $\text{RSD} = 3,80 \%$. Mjerenjem smjesa otopina realnog uzorka i standardne otopine glutationa različitih koncentracija vrednovana je točnost metode. Uspoređeni su rezultati određivanja glutationa u realnom uzorku predloženom metodom i metodom preporučenom farmakopejom. Slaganje rezultata ($52,00 \text{ mg}$ i $50,86 \text{ mg}$) upućuje na točnost metode.

Ključne riječi: slijedna analiza injektiranjem, glutation, spektrofotometrija

Rad sadrži: 69 stranica, 29 slika, 7 tablica, 0 dodataka, 24 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. doc.dr.sc. Franko Burčul - predsjednik
2. dr.sc. Ivana Škugor Rončević, znanstveni suradnik - član
3. doc.dr. sc. Lea Kukoč Modun – član-mentor

Datum obrane: 27. listopada 2017.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35 i knjižnici Medicinskog fakulteta u Splitu, Šoltanska 2.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Faculty of chemistry and technology and School of medicine
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Croatia

Scientific area: Biomedical sciences
Scientific field: Pharmacy
Course title: Instrumental methods of analysis
Thesis subject: was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy as well as by Faculty council of Faculty of Chemistry and Technology and Faculty council of School of Medicine
Menthor: doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun
Technical assistance: mag. ing. chem. ing. Maja Biočić

Sequential injection analysis of glutathione in pharmaceutical formulations using spectrophotometric detector. Development and validation of the method

Ante Rogošić, index number: 67

Summary:

A method for determination of glutathione using sequential injection analysis had been optimized and validated. The method is based on a redox reaction between glutathione and Cu(II)-neocuproine complex where glutathione is a reductant. Reaction products are oxidised form of glutathione (GSSG) and Cu(I)-neocuproine complex which reaches its absorption maximum at $\lambda = 458$ nm. Optimized parameters of flow system include sequence of injection of sample and reagent, rate of flow of carrier solution, volumes of injection of sample and reagent, volume of holding coil and length of reaction coil. Optimized method parameters were used to plot the calibration curve. The following equation had been determined: $y = 3270 x - 0,0010$. Linearity is achieved at analyte concentrations ranging from $6,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ to $8,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Limit of detection is $\text{LOD} = 2,20 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ while the limit of quantification is $6,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Following compounds interfere: acetylsalicylic acid, tartaric acid, citric acid and sodium citrate. Repeatability was confirmed based on results of 15 sequential injections of standard solution of glutathione. Relative standard deviation was 3,80 %. Method accuracy was validated by determining concentrations of mixed solutions composed of glutathione standard solution and glutathione real sample solution. Results of the developed method were compared with results of pharmacopoeial method. Similar results (52,00 g and 50,86 g) indicate method accuracy.

Keywords: sequential injection analysis, glutathione, spectrophotometry

Thesis contain: 69 pages, 29 pictures, 7 tables, 0 supplements, 24 references

Original in: Croatian

Defense comitee:

1. Franko Burčul, PhD, assistant professor - chair person
2. Ivana Škugor Rončević, PhD, scientific associate - member
3. Lea Kukoč Modun, PhD, assistant professor - supervisor

Defense date: 27th October 2017.

Printed and electronic (pdf format) version of this thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and technology, Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Split, Šoltanska 2.

Sadržaj

1.	Uvod.....	1
1.1.	Glutation	2
1.1.	Kinetičke metode analize.....	6
1.2.1.	Zakon brzine kemijske reakcije.....	7
1.2.2.	Red reakcije	7
1.2.3.	Zakon brzine za reakcije pseudoprvog reda	8
1.2.	Slijedna analiza injektiranjem	10
1.2.1.	Formiranje zone.....	11
1.3.	Spektroskopija	12
1.3.1.	Elektromagnetski spektar	12
1.3.2.	Apsorpcija zračenja	12
1.3.3.	Molekulska apsorpcijska spektrofotometrija.....	13
1.3.4.	Transmitancija	14
1.3.5.	Apsorbancija.....	14
1.3.6.	Odnos između apsorbanije i koncentracije: Beerov zakon.....	15
1.3.7.	Ograničenja Beerova zakona.....	15
2.	Cilj istraživanja	16
3.	Materijali i metode	18
3.1.	Dijelovi SIA sustava.....	19
3.1.1.	Programiranje protoka.....	20
3.2.	Instrumenti u optičkoj spektrometriji	21
3.3.	Ostali uređaji i oprema	25
3.4.	Priprava otopina.....	26
3.5.	Priprava otopina za određivanje glutaciona metodom koju propisuje farmakopeja ..	27
3.6.	Standardizacija otopine joda (I_2) koncentracije $0,05 \text{ mol L}^{-1}$	28
4.	Rezultati	29
4.1.	Optimizacija redoslijeda injektiranja	31
4.2.	Optimizacija brzine protoka osnovne otopine	32
4.3.	Optimizacija volumena injektiranja reagensa.....	34
4.4.	Optimizacija volumena injektiranja analita	36
4.5.	Optimizacija volumena petlje zadržavanja.....	38
4.6.	Optimizacija duljine reakcijske petlje	39

4.7.	Odabir omjera koncentracija reagensa	41
4.8.	Odabrani parametri protočnog sustava	43
4.9.	Linearno dinamičko područje	44
4.10.	Granica dokazivanja i granica određivanja	46
4.11.	Vrednovanje metode	47
4.11.1.	Utjecaj interferencija	47
4.11.2.	Ponovljivost	49
4.11.3.	Iskoristivost metode	50
4.12.	Analiza realnog uzorka	52
4.13.	Određivanje glutaciona metodom koju propisuje farmakopeja	53
5.	Rasprava	55
6.	Zaključak	58
7.	Popis citirane literature	60
8.	Sažetak	64
9.	Summary	66
10.	Životopis	68

Zahvala

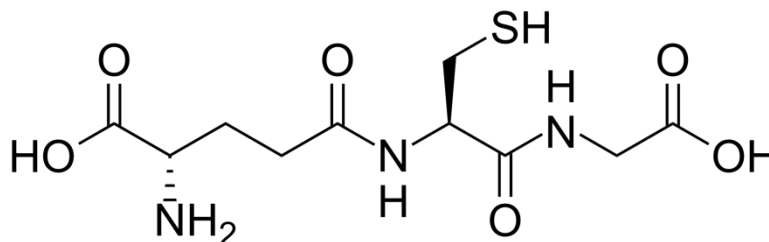
Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Lei Kukoč Modun te neposrednoj voditeljici Maji Biočić, mag. ing. chem. ing. na pomoći pri izradi diplomskog rada kao i ostalima koji su na bilo koji način pomogli pri izradi ovoga rada.

Obitelji i prijateljima zahvaljujem na podršci i razumijevanju koje su mi pružali za vrijeme cjelokupnog obrazovanja.

1. Uvod

1.1. Glutation

Glutation (GSH) je tripeptid koji se sastoji od glicina, cisteina i glutaminske kiseline (slika 1.1). Molekulska formula spoja je $C_{10}H_{17}N_3O_6S$, a molarna masa iznosi $307,32 \text{ g mol}^{-1}$. Poznat je i pod imenom γ -L-glutamil-L-cisteinglicin dok naziv po IUPAC nomenklaturi glasi {(2S)-2-amino-5-[(2R)-1-(karboksimetilamino)-1-okso-3-sulfanilpropan-2-il]amino}-5-okso-pentanoična kiselina. Nalazi se u krutom stanju, a temperatura tališta iznosi 195°C [1].

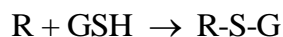


Slika 1.1. Strukturna formula glutathiona [2]

Prisutan je u svim tkivima gdje ima ulogu antioksidansa [1]. Konjugacijom s određenim spojevima doprinosi njihovoj eliminaciji što predstavlja dodatno detoksifikacijsko djelovanje [3].

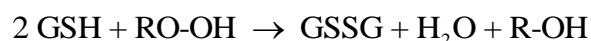
Sinteza glutathiona u stanicama se odvija posredstvom enzima glutamat-cistein-ligaze čijim se djelovanjem glutamat i cistein spajaju u dipeptid γ -glutamilcistein [4]. Enzim glutation-sintetaza dodaje glicin na nastali dipeptid čime nastaje tripeptid glutation. Prisutan je mehanizam negativne povratne sprege čime je spriječena povećana proizvodnja glutathiona. Ograničavajući korak u sintezi glutathiona predstavlja aktivnost enzima glutamat-cistein-ligaze (GCL) te prisutstvo aminokiseline, najčešće L-cisteina [5]. Stoga se kod manjka glutathiona ponekad preporučuje uzimanje L-acetilcisteina koji se pretvara u L-cistein i sudjeluje u nastajanju glutathiona [6].

Glutation je prisutan u dva oblika: reduciranom (GSH) i oksidiranom (GSSG). Iz njihovog omjera moguće je dobiti podatke o oksidacijskom stanju stanice. U većini je stanica omjer GSH-a prema GSSG-u veći od 500 [7]. Oksidirani se oblik može prevesti u reducirani djelovanjem enzima glutation-reduktaze, flavoproteina koji se kao izvorom elektrona koristi molekulom NADPH. Svojstva glutathiona pripisuju se među ostalim i djelovanju enzima glutation-S-transferaze. Ti enzimi kataliziraju reakcije konjugacije mnogih potencijalno otrovnih elektrofilnih ksenobiotika uključujući i neke karcinogene sa glutationom prema sljedećoj reakciji:



gdje je R elektrofilni ksenobiotik. U ljudskim tkivima nalazimo različite glutation-S-transferaze koje pokazuju različitu specifičnost prema supstratu. Najviše ih je u citosolu jetrenih stanica dok su u ostalim tkivima prisutne u manjim količinama. Ukoliko bi izostala konjugacija potencijalno toksičnih ksenobiotika sa GSH, isti bi se mogli vezati na DNA, RNA ili stanične proteine uzrokujući tako značajna oštećenja stanica. Tkivo sa smanjenom koncentracijom GSH postaje sklonije oštećenjima spojevima koji bi se inače konjugirali s GSH.

Enzimi glutation-peroksidaze doprinose detoksifikaciji kataliziranjem reakcije glutationa sa vodikovim i organskim peroksidima prema sljedećoj reakciji:



GSH je uključen i u ciklus za koji se pretpostavlja da prenosi aminokiseline kroz membrane bubrega:



Ovom se reakcijom pospješuje prijenos određenih aminokiselina kroz stanične membrane nakon čega se aminokiselina hidrolizira iz kompleksa sa GSH, a GSH se resintetizira iz cisteinilglicina. Ta je reakcija katalizirana enzimom γ -glutamil-transferaza (GGT) koji se nalazi na membrani bubrežnih tubula i u stanicama žučnih kanala. Također se nalazi i u endoplazmatskoj mrežici hepatocita odakle se oslobađa u krv pa iz toga proizlazi njegova dijagnostička važnost u hepatobilijarnim bolestima [8]. Niska razina glutationa prisutna je u Parkinsonovoj bolesti što uzrokuje ranije propadanje stanica živčanog sustava [9].

Iako je u počecima isticana skeptičnost prema djelotvornosti oralnih preparata glutationa, određena su istraživanja pokazala da uzimanje dodataka prehrani sa sadržajem GSH od 250 mg do 1000 mg povećava razine glutationa u stanicama [10]. Oralni dodaci prehrani na bazi glutationa mogu imati doprinos pri smanjenju rizika od gastrointestinalnih poteškoća uzrokovanih patogenom bakterijom *Helicobacter suis* [11].

Istraživanja ukazuju na povezanost poremećaja metabolizma GSH sa mnogim bolestima uključujući bolesti oka, dijabetes, kardiovaskularne bolesti, cističnu fibrozu, astmu,

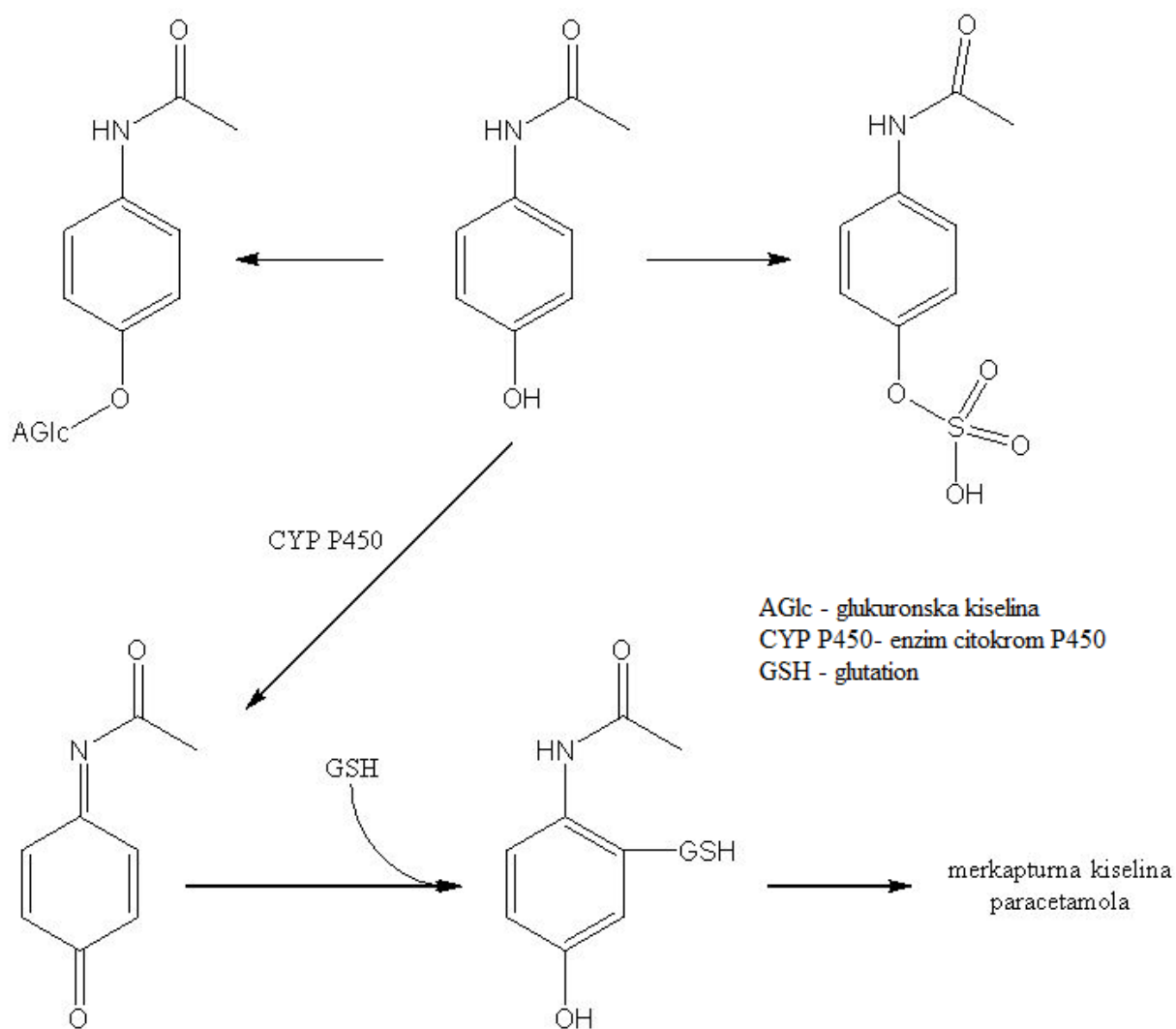
kroničnu opstruktivnu plućnu bolest te neurodegenerativne poremećaje poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti [12]. Kod pacijenata sa HIV-om niska razina glutaciona povećava rizik od bolesti koje nastaju slabljenjem imunološkog sustava [13].

Supstrati u reakcijama konjugacije s glutationom su različiti ksenobiotici i endobiotici elektrofilnih svojstava. Dok neke tvari izravno stupaju u reakciju s glutationom, neke se prethodno moraju transformirati u elektrofilne metabolite. Česti supstrati uključuju karcinogene metabolite tvari poput pesticida, aflatoksina B1, lijekova neoplastika, herbicida i reaktivnih karbolina nastalih endogenim reakcijama oksidacijskog stresa.

Reakcije konjugacije su katalizirane enzimima glutation-*S*-transferaze koji kataliziraju stvaranje tioeterskih konjugata između glutaciona i ksenobiotika. To je skupina enzima podijeljenih u različite klase temeljem slijeda aminokiselina. Kod pušača s manjkom enzima GSTM1 povećan je rizik od karcinoma pluća. Tioeterski se konjugati mogu izlučivati putem žuči ili se daljnim reakcijama mogu prevesti u merkapturane kiseline i izlučiti urinom [14].

GSH ima važnu ulogu u konjugaciji kiselina. Pretežno se konjugiraju ariloctene kiseline. Indolactena kiselina, sastavni dio auksina koji doprinose rastu biljaka, konjugira se s glutationom posredstvom enzima glutamin-*N*-acetiltransferaze, a kao produkt nastaje indolacetilglutamin. Kod metabolizma halucinogena meskalina reakcijama O-dealkilacije i oksidativne deaminacije nastaje 3,4-dihidroksi-5-metoksifenilactena kiselina. Ona daljnjom konjugacijom s glutationom daje 3,4-dihidroksi-5-metoksifenilacetilglutamin [14].

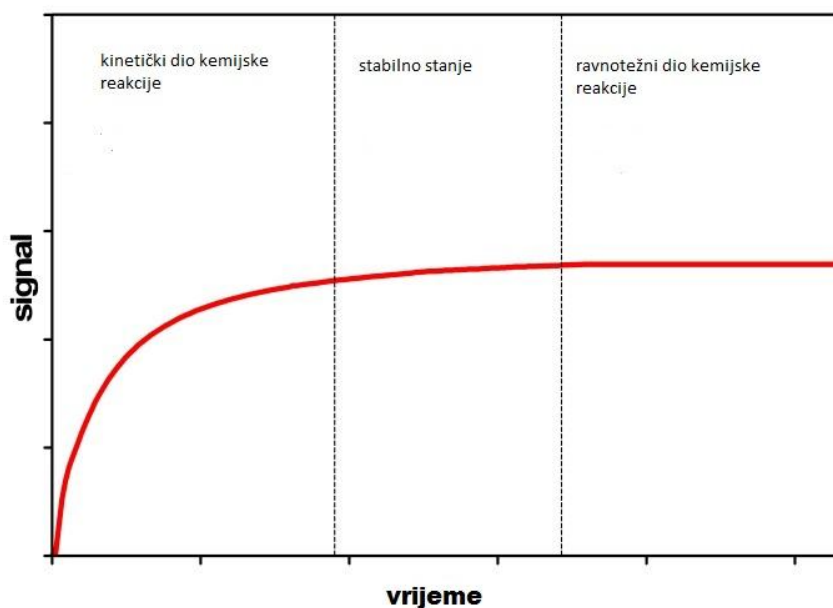
Kod analgetika i antipiretika paracetamola glutation sudjeluje u uklanjanju štetnih produkata metabolizma. Dehidrogenacijom paracetamola enzimima citokrom P450 nastaje *N*-acetil-*p*-benzokinon. Kod visokih doza paracetamola se ovaj toksičan spoj kovalentno veže na proteine jetre i bubrega uzrokujući oštećenja spomenutih organa. Redukcija s oksidiranim oblikom glutaciona ponovno prevodi *N*-acetil-*p*-benzokinon u paracetamol. Konjugacijom s reduciranim oblikom glutaciona, točnije adicijom glutaciona na dvostruku vezu, vraća se aromatski karakter reaktivnom metabolitu (slika 1.2). Kao konačan produkt ove konjugacije nastaje merkapturana kiselina koja se izlučuje mokraćom. Stoga su kod trovanja paracetamolom prisutne manje količine GSH u stanicama jetre [14].



Slika 1.2. Uloga glutationa u uklanjanju toksičnih metabolita paracetamola

1.1. Kinetičke metode analize

Slijedna analiza injektiranjem spada u kinetičke metode analize. Za razliku od ravnotežnih metoda analize kod kojih se signal bilježi kada je reakcija u ravnotežnom ili prihvatljivo stabilnom stanju, kod kinetičkih se metoda signal bilježi i kada reakcija nije u stanju termodinamičke ravnoteže. To ih čini povoljnima za analize temeljene na sporim kemijskim reakcijama [15].



Slika 1.3. Ovisnost visine signala o proteklom vremenu reakcije

Kod kinetičkih metoda mjerenja se provode pod dinamičkim uvjetima, a kao analitički parametar služi nastajanje produkta ili nestajanje reaktanata. Kako bi reakcija mogla poslužiti kao osnova za kinetička mjerenja mora ispuniti sljedeće uvjete:

- brzina reakcije ne smije biti ni prebrza ni prespora;
- treba biti poznat zakon brzine reakcije;
- način kontinuiranog praćenja koncentracije barem jedne vrste iz odabrane reakcije mora biti poznat.

Brzina kemijske reakcije mora biti dovoljno velika da se reakcija okonča u prihvatljivom vremenu, a opet ne toliko brza da ostvari svoju potpunost u fazi miješanja reaktanata [15].

1.2.1. Zakon brzine kemijske reakcije

Zakoni brzine nastali su iz mjerenja brzine utroška reaktanata ili nastajanja produkata u ovisnosti o varijablama kao što su koncentracije reaktanata i produkata, temperatura, tlak, pH vrijednost ili ionska jakost. Oni predstavljaju algebarske izraze koji se sastoje od koncentracijskih izraza i konstanti.

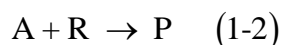
Brzina kemijske reakcije može se računati mjerenjem promjena koncentracije. U kinetičkom dijelu reakcije nakon nastanka produkta moguća je povratna reakcija koja stvara izvorne reaktante. U tom je slučaju brzina kemijske reakcije jednaka razlici brzina polazne i povratne reakcije što se opisuje izrazom:

$$\text{brzina} = \text{polazna brzina} - \text{povratna brzina} \quad (1-1)$$

Ipak, budući da je na samom početku kemijske reakcije koncentracija reaktanata mnogo veća od koncentracije produkata povratna se brzina može zanemariti. Ukoliko kemijska reakcija teži potpunosti (konstanta ravnoteže $\gg 1$) povratna reakcija nije podržana. Iz navedenog proizlazi kako se mjerena brzina odnosi na polazni smjer te se utjecaj povratne reakcije zanemaruje [15].

1.2.2. Red reakcije

Red reakcije utvrđuje se eksperimentalno za svaku odabranu reakciju. Za kemijsku reakciju



gdje A označava analit, R reagens, a P produkt zakon brzine prikazan općom jednačbom ima oblik:

$$-\frac{dA}{dt} = k[A][R] \quad (1-3)$$

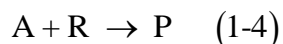
gdje je brzina jednaka derivaciji koncentracije A, R ili P po vremenu. Prve dvije brzine imaju negativan predznak jer se napredovanjem reakcije smanjuju koncentracije analita i reagensa (A i R) dok treća ima pozitivan predznak jer koncentracija produkta (P) raste. U tom je izrazu k konstanta brzine reakcije, m je red reakcije u odnosu prema analitu, a n je red reakciju u odnosu prema reagensu. Ukupan red reakcije predstavlja zbroj reda reakcije u odnosu na

analit (m) i reda reakcije u odnosu na reagens (n). Ukoliko je $m = 1$, a $n = 2$ ukupna je reakcija trećeg reda [16].

Kod kinetičkih metoda analize uglavnom nisu upotrebljive reakcije prvog reda budući da se analiza temelji na reakcijama koje uključuju barem dvije vrste, analit i reagens. Međutim, zakon brzine za takve reakcije je najčešće složen te nije upotrebljiv u analitičke svrhe. Jedine reakcije koje se mogu upotrijebiti za kinetičke metode analize su reakcije koje se mogu izvesti pod uvjetima koji dozvoljavaju pojednostavljenje složenog zakona brzine u oblik analogan zakonu brzine za reakcije prvog reda. Takve se reakcije zovu reakcijama pseudoprvog reda [16].

1.2.3. Zakon brzine za reakcije pseudoprvog reda

Kod kemijske reakcije u kojoj reakcijom analita (A) i reagensa (R) nastaje produkt (P) predstavljene sljedećom jednadžbom:



brzina je razmjerna koncentraciji svakog od reaktanata, a zakon brzine glasi:

$$-\frac{dA}{dt} = k[A][R] \quad (1-5)$$

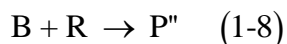
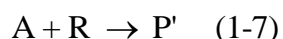
Navedena reakcije je prvog reda u odnosu prema svakom od reaktanata a ukupno je drugog reda. Ukoliko se koncentracija reaktanta R odabere tako da je puno viša od reakcije reaktanta A te vrijedi $[R] \gg [A]$, koncentracija R se vrlo malo mijenja tijekom reakcije te se može smatrati konstantnom i za nju se može pisati $k[R] = \text{konstanta} = k'$. Tada jednadžba za brzinu reakcije iznosi:

$$-\frac{dA}{dt} = k'[A] \quad (1-6)$$

Takva je jednadžba oblikom istovjetna jednadžbi za reakciju prvog reda stoga za ovu reakciju kažemo da je pseudoprvog reda u odnosu prema reaktantu A. Iako se kod ovakvog određivanja brzine kemijske reakcije javljaju pogreške, one su zanemarive. Primjerice kod stostrukog suviška reagensa pogreška iznosi 0,4 % dok pedeseterostruki suvišak reagensa uzrokuje pogrešku od 1 %. Te su vrijednosti uglavnom prihvatljive u kinetičkim metodama analize [16].

Kod razvoja kinetičkih metoda važno je ostvariti brzo miješanje reaktanata te utvrditi vrijeme miješanja odnosno vrijeme proteklo od dodavanja analita u reakcijsku otopinu do prvog pouzdanog mjerenja koncentracije odabrane vrste. To se postiže odabirom pogodnih naprava za brzo i potpuno miješanje. Za vrijeme miješanja analita i reagensa kemijska reakcija napreduje sporije nego što je opisano izrazom za brzinu reakcije. Za kvantitativnu analitičku iskoristivost kinetičkih metoda bitan je i izbor mjernih tehnika koje pružaju mogućnost praćenja analita ili produkta kemijske reakcije s vremenom. Kao mjerne tehnike često se primjenjuju potenciometrija te apsorpcijska i emisijska spektrometrija [15].

Kinetičke metode koje se primjenjuju za određivanje anorganskih i organskih vrsta dijele se na katalizirane i nekatalizirane. Dok katalizirane metode imaju širu primjenu zbog veće selektivnosti i osjetljivosti, nekatalizirane se metode često primjenjuju uz automatizirana mjerenja ili ako je osjetljivost detekcijske metode velika. Još jedno od područja primjene kinetičkih metoda analize je i određivanje komponenata smjese. Za takva je određivanja važno da vrste imaju dovoljno različitu brzinu unutar iste reakcije. Ukoliko vrste A i B reagiraju sa reagensom i tvore produkt u sljedećim reakcijama pseudoprvog reda:



tako da se konstante reakcija k_a i k_b značajno razlikuju ($k_a > k_b$ te $k_a/k_b > 500$) moguće je određivanje vrste A bez bitnih interferencija vrste B [16].

1.2. Slijedna analiza injektiranjem

Slijedna analiza injektiranjem (eng. *Sequential injection analysis*, SIA) spada u drugu generaciju protočnih metoda. Prvi su je puta opisali Ruzicka i Marshall 1990. godine. Od tada je metoda konstantno usavršavana te danas postoje različite izvedbe kao primjerice „laboratorij na ventilu“ (engl. *Lab-on-valve*) miniaturizirani format [17].

Ova se metoda temelji na ubrizgavanju niza reagensa i uzoraka u struju otopine nositelja. U najjednostavnijoj se konfiguraciji zona uzorka i zona reagensa injektiraju jedna pored druge. Nakon ubrizgavanja dolazi do raspršenja uzorka unutar reagensa. Na njihovom se sučelju formira produkt reakcije (slika 3.1). Prolaskom nastalog produkta kroz detektor mjere se promjene u zadanom parametru. Za razliku od protočne analize (eng. *Flow injection analysis*, FIA), slijedna analiza podrazumijeva zaustavljanje protoka u određenim stupnjevima procesa. Time se smanjuje potrošnja uzorka i reagensa te količina otpada. Iz toga proizlazi kako je ekonomičnost jedna od glavnih prednosti slijedne analize [17].

Već spomenuta usavršavanja tehnike uključuju i programiranje toka za podešavanje protoka čime se postiže optimizacija pojedinih koraka ispitivanja. Tehnika razdvajanja uzoraka omogućuje podvrgavanje odabrane količine analiziranog uzorka različitim tretmanima što daje višestruke informacije kao istovremena analiza dvaju analita uz uporabu aparata koji se sastoji od jednog ventila i jedne crpke. [17]

Uz ekonomičnost analize koja se ogleda u manjoj potrošnji reagensa i uzorka, rasprostranjenosti uporabi slijedne analize injektiranjem doprinose i digitalna obrada uzorka te prilagodljivost metode [17].

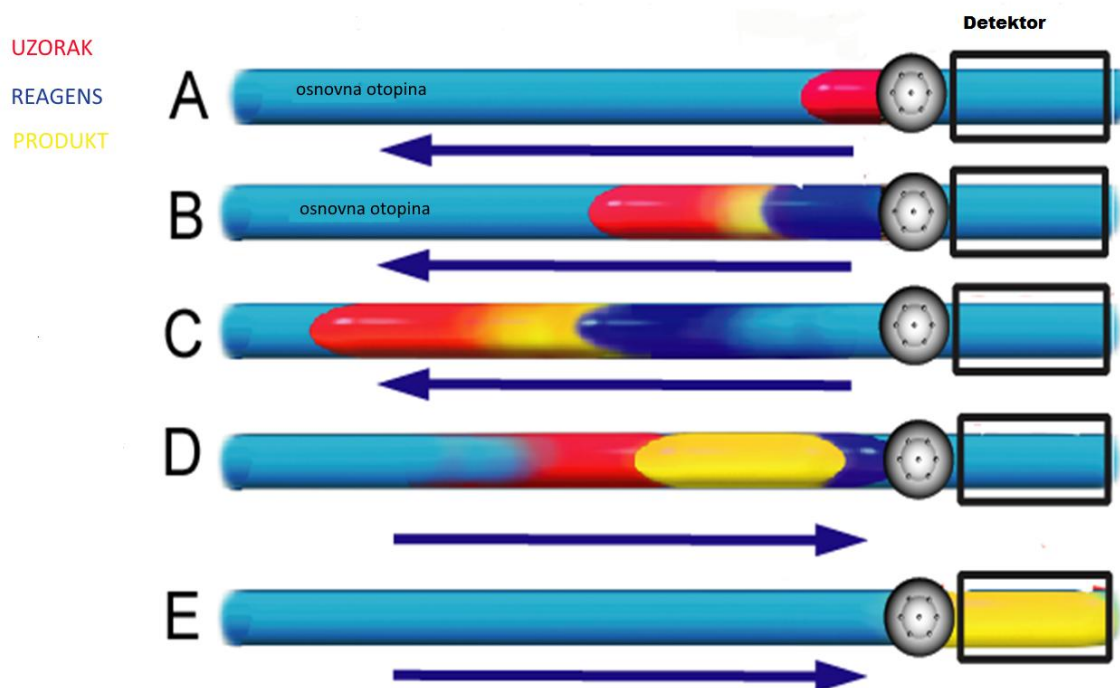


Slika 1.4. Slijedna analiza injektiranjem: raspršenjem uzorka (crveno) u reagensu (plavo) na njihovom sučelju nastaje produkt (žuto) [17]

1.2.1. Formiranje zone

Kako je prethodno rečeno nakon injektiranja vrsta u struju otopine nositelja dolazi do njihovog međusobnog miješanja. Proces je poznat pod nazivom raspršenje (disperzija) te na njega utječu konvekcija i difuzija. Konvekcija uzorka je posljedica laminarnog toka u kojemu se brzina strujanja uzorka razlikuje ovisno o položaju u odnosu na stijenku cjevčice. Tako je brzina slojeva koji su neposredno uz stijenku jednaka nuli dok se oni u središnjem dijelu cjevčice gibaju najvećom brzinom. Kao rezultat, zona uzorka poprima paraboličan oblik. Difuzija je rezultat koncentracijskog gradijenta između uzorka i osnovne otopine. Javlja se radijalno i aksijalno u odnosu na smjer gibanja fluida. Radijalna difuzija smanjuje brzinu uzorka u sredini cjevčice dok brzina strujanja uz stijenke raste [18]. Budući da je ona važnija u slijednoj analizi injektiranjem, suvremeni SIA sustavi dizajnirani su na način da je radijalna difuzija maksimalna.

Kod slijedne analize injektiranjem reagens (B) prodire u zonu uzorka (A) zbog aksijalne disperzije dok se kao spojena zona (C) gibaju uzvodno. Promjenom smjera toka (D) dolazi do turbulentnih strujanja uzrokovanih ubrzanjem radijalnog i aksijalnog raspršenja. Radijalno raspršenje je završeno kada smjesa uzorka i reagensa, koja je u ovom trenutku već prešla u produkt reakcije, dođe do detektora (E) [17]. Proces je prikazan na slici:



Slika 1.5. Formiranje zone kod slijedne analize injektiranjem

1.3. Spektroskopija

Izraz spektroskopija odnosi se na granu znanosti koja se bavi vidljivim zračenjem (svjetlošću) razlučenim u komponente koje tvore spektar [16].

1.3.1. Elektromagnetski spektar

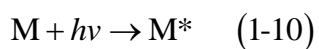
Elektromagnetsko zračenje je vrsta energija koja velikom brzinom prolazi prostorom. Opisuje se pomoću klasičnog valnog modela čiji su osnovni parametri valna duljina, frekvencija, brzina i amplituda. Za bolje razumijevanje pretpostavlja se da se elektromagnetsko zračenje sastoji od čestica poznatijih kao fotoni. Njihova energija ovisi o frekvenciji zračenja a opisuje se jednačbom

$$E = h\nu \quad (1-9)$$

gdje h predstavlja Planckovu konstantu ($6,63 \times 10^{-34}$ Js). Elektromagnetski spektar obuhvaća veliko područje valnih duljina i energija od kojih je ljudskom oku vidljiv tek manji dio [16].

1.3.2. Apsorpcija zračenja

Apsorpcija je proces u kojemu neka kemijska vrsta prisutna u propusnoj (prozirnoj) sredini selektivno smanjuje, odnosno prigušuje intenzitet neke frekvencije elektromagnetskog zračenja. Prema kvantnoj teoriji svaka elementarna čestica (ion, atom, molekula) ima jedinstven skup i raspored energetske stanja od kojih je najniže osnovno stanje. Apsorpcija fotona predstavlja prelazak energije fotona na česticu pri čemu ona prelazi u više, pobuđeno stanje. Takav je prelazak moguć samo ukoliko je energija fotona jednaka energetskej razlici osnovnog i nekog od viših stanja elementarne čestice. Pritom energija fotona prelazi na česticu dovodeći je u više energijsko, odnosno pobuđeno stanje:



M^* označava pobuđenu česticu. Nakon kratkog vremenskog razdoblja u trajanju od 10^{-6} do 10^{-9} sekundi dolazi do relaksacije pobuđene vrste do svog osnovnog stanja pri čemu se suvišak energije prenosi drugim atomima ili molekulama u okolini. Proces uzrokuje malo povišenje temperature okoliša, a opisuje se jednačbom:



Relaksacija može nastati i fotokemijskom razgradnjom čestice M^* pri čemu nastaju nove vrste ili fluorescencijskom odnosno fosforescencijskom remisijom zračenja. Zbog kratkog životnog vijeka pobuđenih čestica, njihova je koncentracija u bilo kojem trenutku zanemariva. Toplinska energija koja se otpušta pri povratku u osnovno stanje uglavnom se također ne može detektirati. Iz toga proizlazi da su prednosti apsorpcijskih mjerenja to što se njima energija proučavanog sustava remeti što je najmanje moguće [16].

1.3.3. Molekulska apsorpcijska spektrofotometrija

Molekulska spektrofotometrija u ultraljubičastom i vidljivom području ima široku primjenu u kvantitativnoj analizi. Za apsorpciju ultraljubičastog i vidljivog zračenja odgovorni su zajednički elektroni koji izravno sudjeluju u stvaranju veze te nepodijeljeni vanjski elektroni smješteni uglavnom oko atoma. Valne duljina pri kojima neka organska vrsta apsorbira ovise o jakosti kojom su vezani neki različiti elektroni. Kod jednostrukih veza atomi su toliko čvrsto vezani da su za njihovo pobuđivanje potrebne valne duljine koje pripadaju vakuumskom ultraljubičastom području. To uzrokuje poteškoće u radu zbog kojih spektri jednostrukih veza nisu široko iskorišteni u analitičke svrhe. Kod organskih spojeva sa dvostrukim i trostrukim vezama elektroni su slabije vezani i lakše se pobuđuju. Apsorpcijski se maksimumi takvih spojeva nalaze u lakše dostupnom ultraljubičastom području. Nezasićene organske skupine koje apsorbiraju u ultraljubičastom i vidljivom području nazivaju se kromoforima. Uz njih i organski spojevi koji sadrže sumpor, brom i jod apsorbiraju u ultraljubičastom području, jer ti elementi imaju slabo vezane nepodijeljene elektronske parove koji se lakše pobuđuju od podijeljenih elektronskih parova u zasićenim vezama [16].

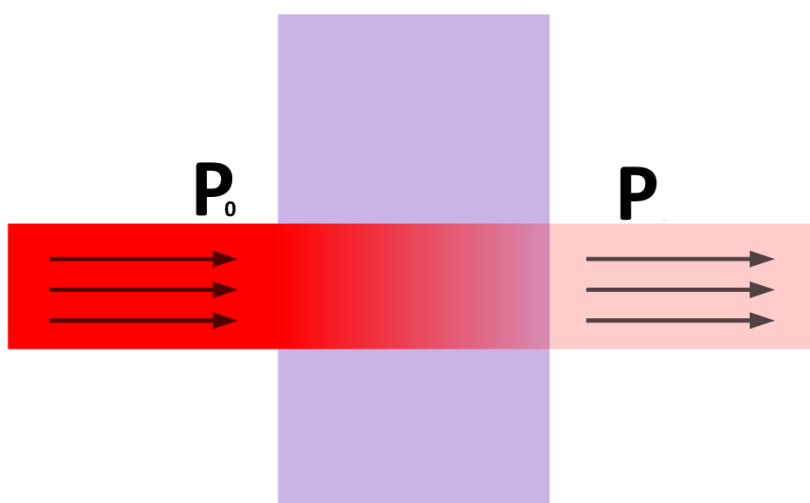
Apsorpcijske značajke neke vrste opisuju se apsorpcijskim spektrom što podrazumijeva grafički prikaz neke funkcije slabljenja osnovnog snopa zračenja u ovisnosti o promjeni valne duljine, frekvencije ili valnog broja. Uzorci za apsorpcijsku analizu u ultraljubičastom i vidljivom području elektromagnetskog zračenja najčešće su plinoviti ili razrijeđene otopine pripravljene u propusnom otapalu. Vertikalna os takvih grafova može biti propusnost (transmitancija) izražena u postocima, apsorbancija ili logaritamska vrijednost apsorbancije [16].

1.3.4. Transmitancija

Transmitancija se definira kao udio upadnog zračenja koje je prošlo kroz otopinu

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (1-12)$$

gdje P_0 predstavlja snagu zračenja snopa prije prolaska kroz otopinu, a P snagu zračenja snopa nakon prolaska kroz otopinu [16].



Silka 1.6. Transmitancija

1.3.5. Apsorbancija

Apsorbancija otopine A definirana je jednadžbom

$$A = -\log T \quad (1-13)$$

Jednadžba zahtjeva da apsorbancijska ljestvica bude logaritamska. Za razliku od transmitancije, apsorbancija otopine se povećava s prigušenjem osnovnog snopa.

Prilikom laboratorijskih mjerenja apsorbancije i transmitancije valja uzeti u obzir gubitke koji su posljedica međudjelovanja zračenja i stijenki posudice u kojoj je smješten uzorak. Za kompenzaciju takvih učinaka uspoređuje se snaga zračenja snopa propuštenog kroz mjernu posudicu punjenu otopinom koja se apsorbira sa snagom zračenja snopa koji prolazi identičnom posudicom punjenom samim otapalom [16].

1.3.6. Odnos između apsorbancije i koncentracije: Beerov zakon

Funkcijski odnos između veličine mjerene apsorpcijskom metodom (A) i one koja se određuje (koncentracija c) poznat je kao Beerov zakon:

$$A = \log\left(\frac{P_0}{P}\right) = abc \quad (1-14)$$

gdje je a konstanta proporcionalnosti, apsorptivnost (apsorpcijski koeficijent), a b duljina puta zračenja kroz uzorak [16].

1.3.7. Ograničenja Beerova zakona

Istinska ograničenja Beerova zakona izražena su samo u relativno koncentriranim otopinama uzorka ili elektrolita. Pri visokim koncentracijama (većim od $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) smanjuju se prosječne udaljenosti među česticama vrste koja apsorbira do stupnja pri kojemu svaka čestica utječe na raspodjelu naboja susjedne čestice. Takvo međudjelovanje može mijenjati njihovu sposobnost apsorpcije pri određenoj valnoj duljini. Budući da doseg međudjelovanja ovisi o koncentraciji ta pojava uzrokuje odstupanja od linearnog odnosa apsorbancije o koncentraciji.

Kod nekih spojeva su odstupanja od Beerova zakona uzrokovana molekulskim međudjelovanjima i kao rezultat ovisnosti apsorptivnosti o indeksu loma otopine. Spomenuti učinci najčešće nisu izraženi pri koncentracijama manjima od $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ [16].

2. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je optimizacija i vrednovanje metode određivanja L-glutathiona slijednom analizom injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor. Optimizaciji prethodi utvrđivanje omjera reaktanata.

Optimizacijom metode obuhvaćeni su sljedeći parametri :

1. Redoslijed injektiranja analita i reagensa
2. Brzina protoka osnovne otopine
3. Volumen injektiranja analita
4. Volumen injektiranja reagensa
5. Volumen petlje zadržavanja
6. Duljina reakcijske petlje

Optimiziranim parametrima protočnog sustava odredit će se analitičke karakteristike metode:

1. Linearno dinamičko područje (LDP)
2. Jednadžba pravca
3. Koeficijent linearne regresije, R^2
4. Granica dokazivanja
5. Granica određivanja

Vrednovanje metode uključit će određivanja:

1. Interferencija
2. Ponovljivosti
3. Točnosti i iskoristivosti

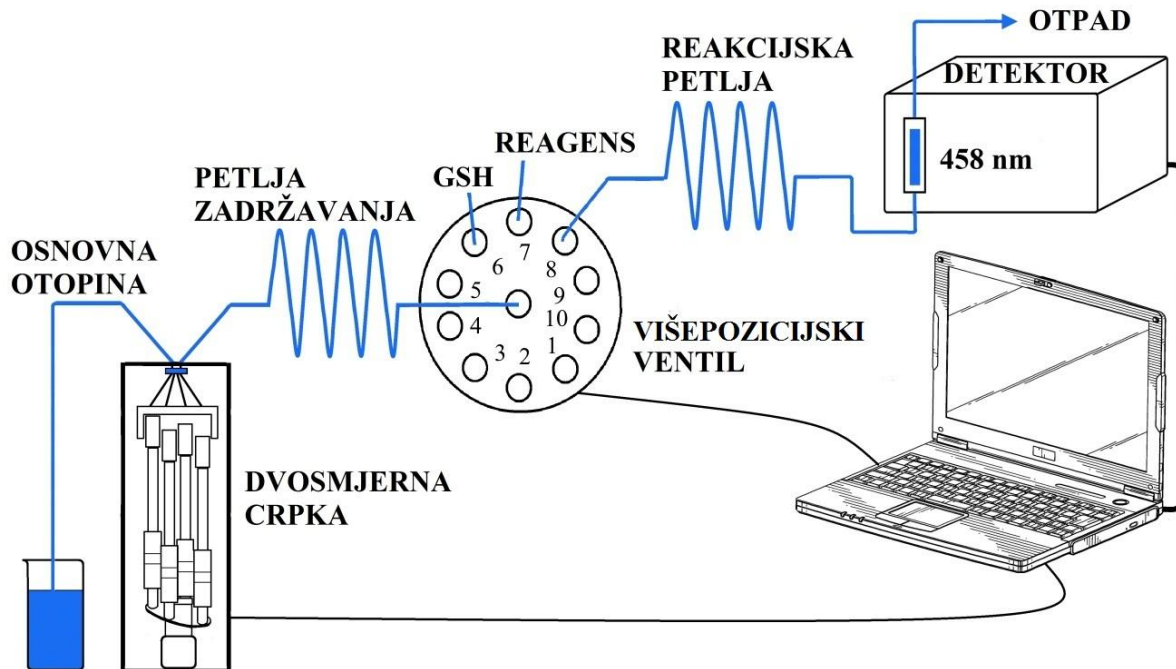
Razvijena i optimizirana metoda će se iskoristiti za određivanje sadržaja L-glutathiona u dodatku prehrani. Rezultati će se usporediti sa standardnom metodom određivanja koju propisuje farmakopeja.

3. Materijali i metode

3.1. Dijelovi SIA sustava

Shema (slika 3.1.) prikazuje SIA sustav korišten za analizu koji se sastoji od sljedećih dijelova:

- dvosmjerna crpka (Vici Valco Instruments, Švicarska) koja usisava osnovnu otopinu (deionizirana voda) u sustav;
- višepozicijski selekcijski ventil (Valco Instruments, Švicarska) sadrži više ulaza kroz koje se ubrizgavaju otopine reagensa i uzorka;
- petlja zadržavanja u koju se slijedno ubrizgavaju reagens i uzorak te strujom osnovne otopine tjeraju u suprotnom smjeru prema reakcijskoj petlji i detektoru;
- reakcijska petlja povezana je sa petljom zadržavanja višepozicijskim selekcijskim ventilom;
- detektor (dvosnopni spektrofotometar Shimadzu UV – 1601, Shimadzu, Kyoto, Japan) služi za detekciju signala nastalog produkta;
- računalo služi za programsku kontrolu sustava (brzina protoka, redoslijed injektiranja, volumeni injektiranja).

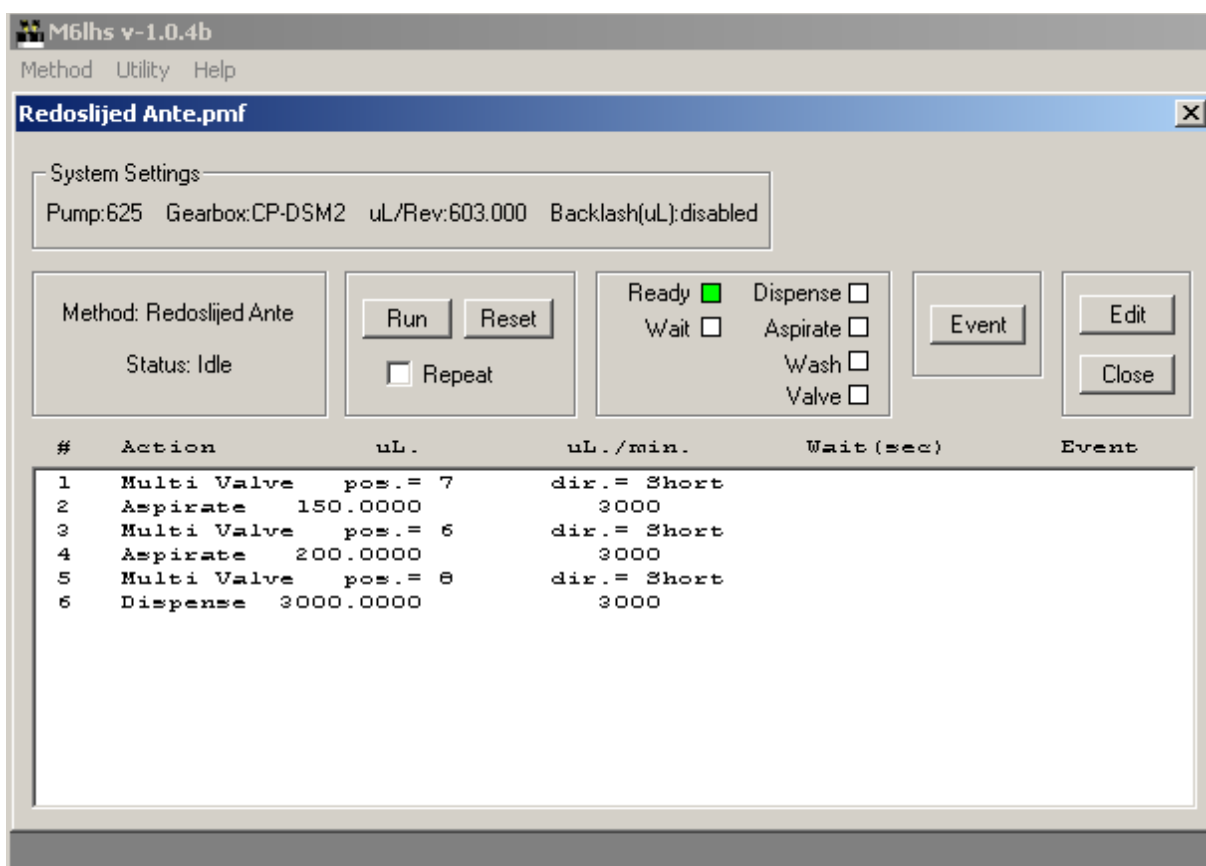


Slika 3.1. Sustav za slijednu analizu injektiranjem

3.1.1. Programiranje protoka

Računalnim programom daju se upute za uvjete i postupke u analizi (slika 3.2.). Na početku rada važno je napuniti sustav otopinama kako bi se uklonili mjehurići zraka.

Mjerenja se provode na način da se određeni volumeni reagensna i uzorka ubrizgavaju u petlju zadržavanja pomoću funkcije usisavanja (eng. *aspirate*). Tako usisane otopine formiraju zajedničku zonu i nošene osnovnom otopinom putuju prema detektoru. Kod optimiziranog programskog slijeda za analizu glutaciona prvo se usisa 150 µL reagensa (pozicija 7 višepozicijskog ventila), a potom 200 µL uzorka (pozicija 6 višepozicijskog ventila). Zatim se dvosmjernom crpkom injektira 3000 µL osnovne otopine. Tok osnovne otopine funkcijom isisavanja (eng. *dispense*) se usmjerava prema otvoru 8 višepozicijskog ventila. Po ubrizgavanju osnovne otopine ona se zajedno sa formiranom zonom reagensa i uzorka kreće prema detektoru prolazeći pritom kroz selekcijski ventil i reakcijsku uzvojniciu.



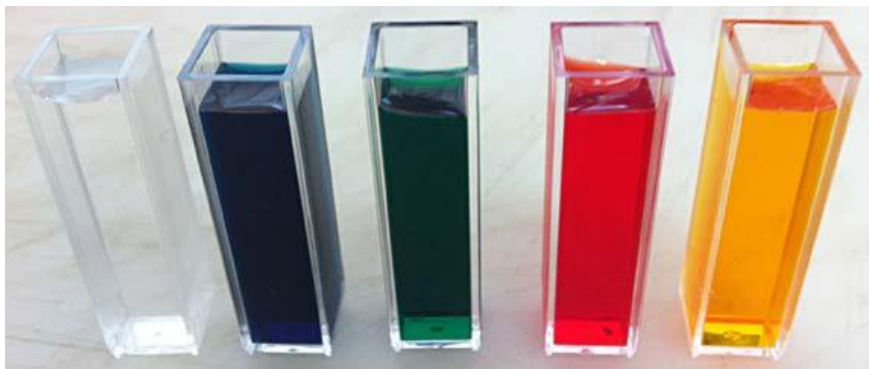
Slika 3.2. Programiranje protoka kod slijedne analize injektiranjem

3.2. Instrumenti u optičkoj spektrometriji

Osnovni dijelovi spektroskopskih uređaja su:

- stabilan izvor energije zračenja;
- selektor valnih duljina koji omogućuje izdvajanje vrlo uske vrpce valnih duljina;
- jednog ili više spremnika za uzorke;
- detektora zračenja ili pretvornika energije zračenja u mjerljiv signal (najčešće električni);
- procesor signala i uređaj za njegovo očitavanje.

Za izradu optičkih dijelova uređaja (leće, kivete, prozori, prizme) važno je odabrati materijal proziran u određenom području. Tako se obično silikatno staklo pretežno rabi u uređajima za primjenu samo u vidljivom dijelu spektra (slika 3.3.). Taljeni silicijev dioksid i kvarc mogu se koristiti u području do 180 nm i 200 nm. Kod infracrvene spektroskopije koriste se tvari kao što je polirani natrijev, kalijev ili srebrov klorid. Navedene tvari u infracrvenom dijelu spektra jako apsorbiraju vlagu te ih je potrebno redovito laštiti do potpune prozirnosti. Važno je redovito održavanje kiveta što uključuje čišćenje prije i nakon uporabe te izbjegavanje dodirivanja. Time se povećava kakvoća spektrometrijskih podataka [16].



Slika 3.3. Kivete za spektrofotometrijska određivanja izrađene od kvarcnog stakla [19]

Za apsorpcijsku i fluorescencijsku spektroskopiju potrebni su vanjski izvori konstantnog i dovoljno snažnog zračenja koje omogućuje jednostavnu detekciju i mjerenje. Za mjerenja u ultraljubičastom području koriste se vodikova i deuterijeva žarulja. Takve žarulje proizvode kontinuirani spektar u području od 160 do 375 nm. Kontinuirani spektar nastaje pobuđivanjem vodika ili deuterija pri niskom tlaku. Pri tome nastaju pobuđene molekule koje disociraju dajući dva vodikova ili deuterijeva atoma i ultraljubičasti foton.

Intenzitet deuterijeve žarulje veći je od intenziteta vodikove što je razlog njezinoj češćoj primjeni. U vidljivom se dijelu spektra koriste volfram/halogen žarulje [16].

Selektorima valnih duljina sužava se mjereno zračenje do uske vrpce koju uzorak emitira ili apsorbira čime se utječe na selektivnost i osjetljivost instrumenta. Osnovni tipovi selektora su monokromatori i filtri. Budući da nije moguće izdvojiti samo jednu valnu duljinu, izdvaja se skupina susjednih valnih duljina koja se naziva vrpcom. Kod vrpce razlikujemo središnju ili nominalnu valnu duljinu i ostale koje su raspoređene oko nje. Efektivna širina vrpce definirana je kao ona širina vrpce izražena u jedinicama valne duljine koja odgovara širini maksimuma u polovici njegove visine. Širine vrpca variraju ovisno o selektoru. Tako kod monokromatora visoke kakvoće za vidljivo područje one iznose nekoliko desetaka nanometara ili manje dok kod apsorpcijskih filtara širine vrpce mogu biti i veće od 200 nm. Kod monokromatora se izlazne valne duljine kontinuirano mijenjaju u relativno širokom spektralnom području dok se kod filtera apsorbiraju sve valne duljine kontinuiranog izvora osim jedne ograničene vrpce [16].

Osnovni dijelovi monokromatora su:

- ulazna pukotina;
- kolimacijske leće ili zrcalo koji proizvode paralelan snop;
- prizma ili rešetka koja raspršuje zračenje u pojedinačne komponente;
- dio za fokusiranje koji projicira niz pravokutnih slika izlazne pukotine na ravnu površinu nazvanu žarišnom ravninom.

Kao disperzna sredstva mogu se koristiti refleksijska rešetka i prizma.

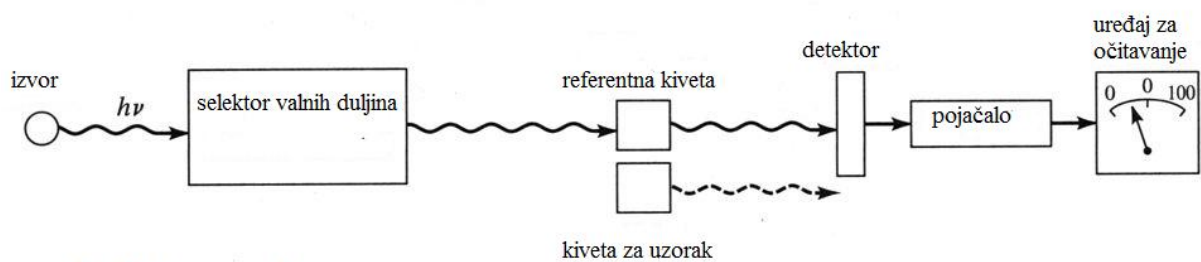
Detektorima zračenja pokazuje se postojanje neke fizičke pojave. Pretvornik je vrsta detektora koji pretvara signale poput svjetlosti, mase, temperature, pH vrijednosti i drugih u električne signale koje je moguće prilagođavati i pretvoriti u broj koji označuje veličinu početnog signala. Osnovni tipovi detektora su fotonski dektektori koji reagiraju na fotone te toplinski koji daju odgovor na promjenu topline [16].

U navedenom spektrofotometru korišten je fotonski detektor odnosno fotomultiplikator. Spomenuti se detektor sastoji od polucilindrične katode koja emitira elektrone kada je izložena zračenju. Emitirani se elektroni ubrzavaju prema dinodi čiji je

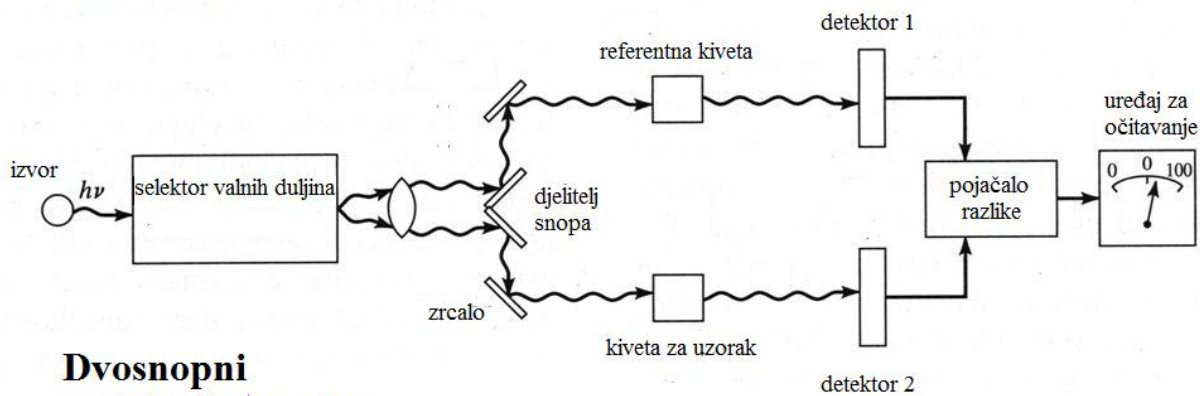
potencijal pozitivniji za 90 V od potencijala katode. Udarom na površinu dinode svaki elektron tvori nekoliko novih elektrona koji se ubrzavaju prema idućoj dinodi čiji je potencijal također za 90 V pozitivniji od prethode. Tu se ubrzani elektroni ponovno umnožavaju. Proces se ponavlja na svakoj dinodi uz umnažanje elektrona. Takvim automatskim unutarnjim pojačanjem od svakog fotona nastaje $10^6 - 10^7$ novih elektrona [16].

Procesori signala su naprave koje pojačavaju električni signal iz detektora. Također mogu mijenjati signal, fazu signala, ukloniti neželjene komponente iz signala filtriranjem te izvoditi određene matematičke operacije na signalu (diferenciranje, integriranje, logaritmiranje) [16].

Osnovne vrste spektroskopskih instrumenata su jednosnopni, dvosnopni-prostorno odijeljeni, dvosnopni-vremenski odijeljeni i višekanalni instrumenti (slika 3.4.). Jedsnosnopni se instrumenti sastoje od jednog izvora zračenja te se kivete umeću i mjere naizmjenice. To otežava mjerenja kod kojih se apsorbancija prati kao funkcija proteklog vremena. Kod dvosnopnih se fotospektrometara koriste dva snopa zračenja nastala od zrcala u obliku slova V koje se još naziva i djeliteľjem snopa. Jedan od njih prolazi kroz kivetu sa uzorkom a drugi istovremeno prolazi kroz kivetu u kojoj se nalazi referentna otopina. Potom se signali prikupľjeni putem pridruženih fotodetektora računalno obrađuju te se na uređaju za očitavanje prikazuje njihov omjer ili logaritam njihovog omjera [16].



Jednosnopni spektrofotometar



Dvosnopni spektrofotometar

Slika 3.4. Shematski prikazi jednosnopnog i dvosnopnog spektrofotometra

3.3. Ostali uređaji i oprema

Za mjerenja pH vrijednosti korišten je milivoltmetar Toledo Seven Multi (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švicarska) sa kombiniranom staklenom elektrodom, Mettler Toledo InLab® 413.



Slika 3.5. Milivoltmetar korišten za mjerenje pH vrijednosti [20]

Za mjerenje mikrolitarskih volumena korištene su mikropipete po Eppendorfu (Nichiro, Tokyo, Japan).



Slika 3.6. Pipeta korištena za mjerenje mikrolitarskih volumena [21]

3.4. Priprava otopina

Za pripravu otopina korištene su kemikalije analitičkog stupnja čistoće te kao otapalo deionizirana voda.

3.4.1. Deionizirana voda

Deionizirana voda pripravljena je sljedećim postupcima: reverzna osmoza, uklanjanje nečistoća filtracijom kroz aktivni ugljen, uklanjanje mikroorganizama filtracijom kroz membranski filter s porama 0,22 μm , deionizacija kroz kationski i anionski izmjenjivač. Za pripravu deionizirane vode korišten je uređaj Mili Q (Milipore, Saint Quentin, Yvelines, Francuska), a otpor pripravljene vode iznosi 18,2 M Ω .

3.4.2. Otopina acetatno-boratnog-fosfatnog pufera (pH = 2)

Otopina pufera pripremljena je otapanjem 4,9464 g borne kiseline $\{\text{H}_3\text{BO}_3, M = 61,83 \text{ g mol}^{-1}$ (Alkaloid, Skopje, Makedonija) $\}$ u malo destilirane vode te dodavanjem 4,7980 g octene kiseline $\{\text{CH}_3\text{COOH}, M = 60,05 \text{ g mol}^{-1}$ (VWR Chemicals, Francuska) $\}$ i 5,4580 g fosforne kiseline $\{\text{H}_3\text{PO}_4, M = 98,00 \text{ g mol}^{-1}\}$ uz nadopunjavanje destiliranom vodom do oznake u odmjernoj tikvici od 2,0 L. Dobivena otopina ima pH vrijednost 2. Daljnje podešavanje viših pH vrijednosti izvršeno je dodavanjem otopine natrijevog hidroksida (NaOH, $c(\text{NaOH}) = 2,0 \text{ mol L}^{-1}$) uz kontrolu pomoću pH-metra.

3.4.3. Otopina natrijevog hidroksida

Otopina natrijevog hidroksida pripravljena je otapanjem 8,0000 g natrijevog hidroksida $\{\text{NaOH}, M = 40,00 \text{ g mol}^{-1}$ (GRAM-MOL d.o.o., Zagreb, Hrvatska) $\}$ u 100 ml deionizirane vode. Koncentracija tako pripravljene otopine iznosi $2,0 \text{ mol L}^{-1}$.

3.4.4. Otopina bakar neokuproina

Otopina bakar neokuproina $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^{2+}$ pripremljena je miješanjem otopina bakra (Cu^{2+}) i neokuproina u molarom omjeru 1 : 2,4. Koncentracija bakra iznosi $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, a koncentracija neokuproina $2,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. 0,0250 g bakrovog sulfata pentahidrata $\{\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}, M = 249,69 \text{ g mol}^{-1}$ (Kemika, Zagreb, Hrvatska) $\}$ i 0,0500 g neokuproin hidrata $\{M = 208,26 \text{ g mol}^{-1}$ (Sigma Aldrich, Steinheim, Austrija) $\}$ otopljeni su u acetatno-boratno-fosfatnom puferu (pH = 3) do volumena od 100 mL. Stabilnost otopine osigurana je čuvanjem u tamnom spremniku pri temperaturi od 4 °C u trajanju od 30 dana.

3.4.5. Standardna otopina glutationa

Standardna otopina L-glutathiona {L-GSH, $M = 307,32 \text{ g mol}^{-1}$ (Sigma Aldrich, Steinheim, Austrija)} pripremljena je otapanjem 0,0307 g glutathiona u acetatno-boratan-fosfatnom puferu ($\text{pH} = 3,0$) do ukupnog volumena od 100 mL. Koncentracija ovako pripravljene otopine iznosi $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Stabilnost otopine osigurana je čuvanjem u tamnom spremniku pri temperaturi od 4°C .

3.4.6. Otopina realnog uzorka

Za pripravu otopine realnog uzorka korištene su kapsule L-glutathiona (Solaray, Park City, Utah, SAD). Prosječna masa sadržaja jedne kapsule iznosi 0,3079 g, a deklarirani sadržaj glutathiona 50 mg. Otopina je pripremljena otapanjem sadržaja 1 kapsule u 100 ml acetatno-boratan-fosfatnog pufera ($\text{pH} = 3$) nakon čega je dopunjena deioniziranom vodom do oznake od 500 mL.

3.5. Priprava otopina za određivanje glutathiona metodom koju propisuje farmakopeja

3.5.1. Otopina kalijevog jodida (KI)

Standardna otopina 166 g L^{-1} KI je pripremljena otapanjem 16,6 g KI u 100 mL deionizirane vode [22].

3.5.2. Otopina klorovodične kiseline (HCl)

Razrijeđena otopina HCl-a je pripremljena miješanjem 17 mL 35 %-tne otopine HCl sa deioniziranom vodom do oznake od 100 mL [22].

3.5.3. Otopina octene kiseline

Razrijeđena otopina octene kiseline je pripremljena miješanjem 28,6 mL ledene octene kiseline sa deioniziranom vodom do oznake od 100 mL [22].

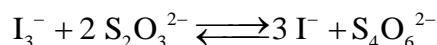
3.5.4. Otopina joda (I_2) koncentracije $0,05 \text{ mol L}^{-1}$

12,7 g I_2 i 20 g KI je otopljeno u destiliranoj vodi i razrijeđeno do oznake od 500 mL. Zbog veće topljivosti joda u otopini jodida prvo je otopljen KI u maloj količini deionizirane vode te potom dodan I_2 . Po njegovu potpunom otapanju dodana je preostala količina vode [22].

3.6. Standardizacija otopine joda (I_2) koncentracije $0,05 \text{ mol L}^{-1}$

U 20 mL otopine joda dodan je 1 ml razrijeđene octene kiseline u 30 mL destilirane vode. Pripravljena se otopina titrira koristeći pripremljenu standardnu otopinu natrijevog tiosulfata $\{c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,1 \text{ mol L}^{-1}, f = 0,9901\}$. Kao indikator se koristi 1 mL otopine škroba.

Redoks-reakcija se odvija prema jednadžbi:



Provedene su dvije titracije uz utrošak $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ od 18,66 mL i 18,68 mL pa je za daljnji proračun korišten volumen od 18,67 mL.

Koncentracija joda u pripremljenoj otopini određivana je prema sljedećem izrazu:

$$n(I_2) = \frac{1}{2} \times n(\text{S}_2\text{O}_3^{2-})$$

$$c(I_2) \times f(I_2) \times V(I_2) = \frac{1}{2} \times c(\text{S}_2\text{O}_3^{2-}) \times f(\text{S}_2\text{O}_3^{2-}) \times V(\text{S}_2\text{O}_3^{2-})$$

$$f(I_2) = \frac{1}{2} \times \frac{c(\text{S}_2\text{O}_3^{2-}) \times f(\text{S}_2\text{O}_3^{2-}) \times V(\text{S}_2\text{O}_3^{2-})}{c(I_2) \times V(I_2)}$$

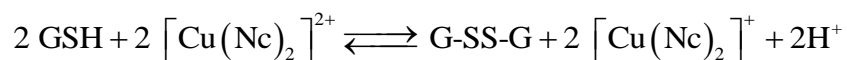
$$f(I_2) = \frac{1}{2} \times \frac{0,1 \text{ mol L}^{-1} \times 0,9901 \times 18,67 \text{ mL}}{0,05 \text{ mol L}^{-1} \times 20 \text{ mL}} = 0,9243$$

$$f = \frac{c_{\text{stvarna}}(I_2)}{c_{\text{nazivna}}(I_2)}$$

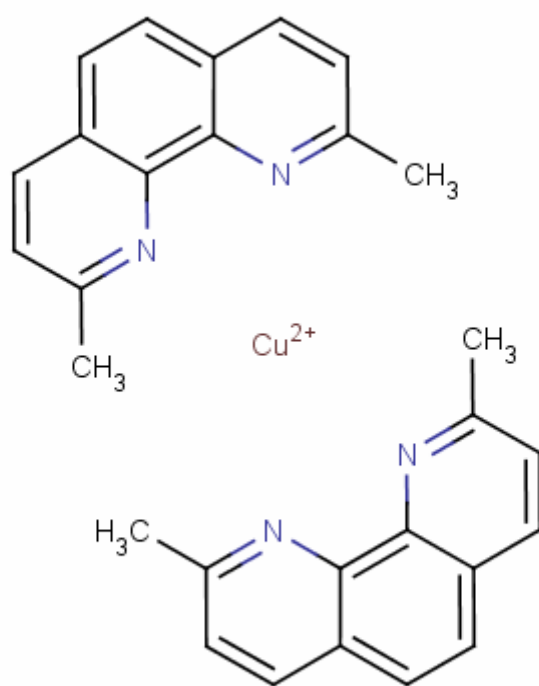
$$c_{\text{stvarna}}(I_2) = f \times c_{\text{nazivna}}(I_2) = 0,9243 \times 0,05 \text{ mol L}^{-1} = 0,0467 \text{ mol L}^{-1}$$

4. Rezultati

Mjerenja se temelje na redoks-reakciji redukcije kompleksa Cu(II)-neokuproin (slika 4.1) u Cu(I)-neokuproin. Tiolna skupina glutationa ima ulogu reducensa.



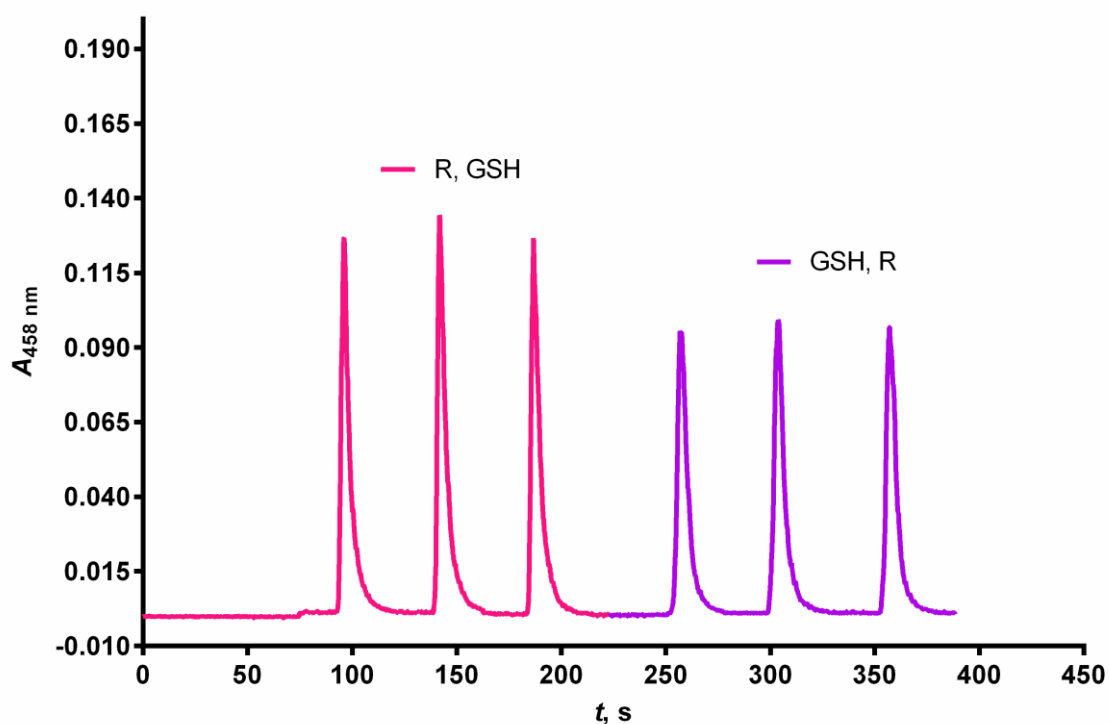
Nastali spoj je kompleks bakar(I)-neokuproin, narančasto-žute boje uz apsorpcijski maksimum pri $\lambda = 458 \text{ nm}$.



Slika 4.1. Kemijska struktura bakar(II)-neokuproin kompleksa [23]

4.1. Optimizacija redoslijeda injektiranja

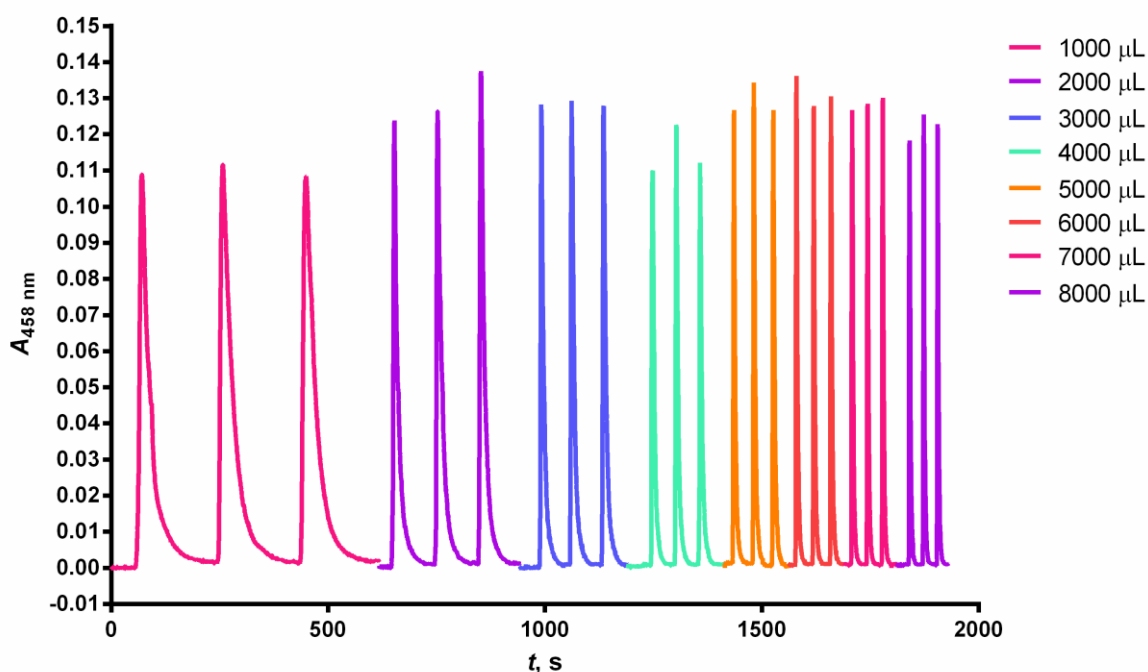
Prilikom optimizacije redoslijeda injektiranja uspoređena je visina signala (apsorbancija) u ovisnosti o redoslijedu injektiranja analita i reagensa. Provedena su dva mjerenja na način da je u jednome prvo injektirana otopina reagensa (kompleksa bakar(II)-neokuproin, R) te potom analit (otopina glutationa, GSH) dok je u drugome redoslijed injektiranja bio obrnut. Veći je signal zabilježen kada se prvo injektira otopina reagensa te je taj redoslijed injektiranja korišten u daljnjim mjerenjima.



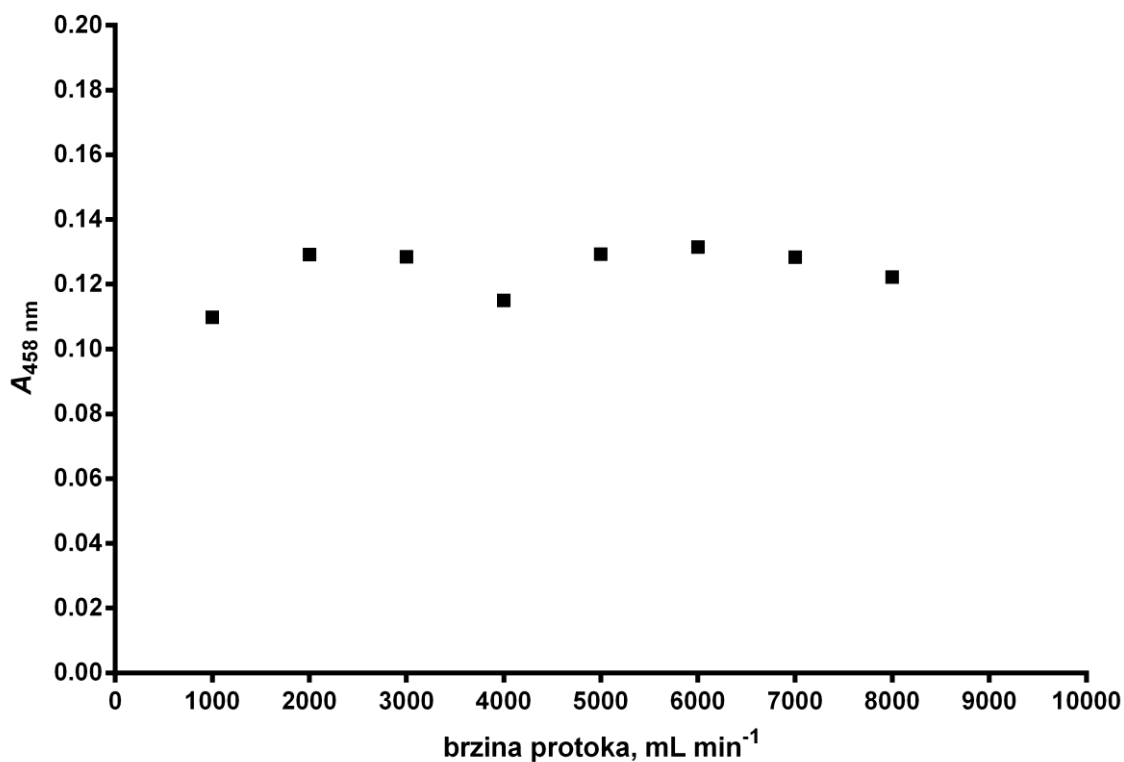
Slika 4.2. Siagram utjecaja redoslijeda injektiranja otopina analita i reagensa. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{GSH}) = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $c([\text{Cu}(\text{Nc})_2]^{2+}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 3$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, protok = $5000 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$, volumen petlje zadržavanja = $1000 \text{ } \mu\text{L}$, duljina reakcijske petlje = 65 cm , volumen injektiranja reagensa = $200 \text{ } \mu\text{L}$, volumen injektiranja analita = $200 \text{ } \mu\text{L}$, volumen osnovne otopine = $3000 \text{ } \mu\text{L}$, volumen protočne kivete = $80 \text{ } \mu\text{L}$, $\lambda = 458 \text{ nm}$.

4.2. Optimizacija brzine protoka osnovne otopine

Brzina protoka ograničavajuć je čimbenik za učestalost analiza. Pri malim brzinama postoji rizik od slabije potpunosti reakcije dok se kod pretjerano velikih brzina ne ostvaruje povrat na baznu liniju. S ciljem odabira optimalne brzine protoka ispitane su različite brzine u rasponu od $1000 \mu\text{L min}^{-1}$ do $8000 \mu\text{L min}^{-1}$. Nakon provedenih mjerenja odabrana je brzina protoka od $3000 \mu\text{L min}^{-1}$. Pri toj je brzini signal dovoljno visok uz istovremeno prihvatljivu širinu pikova i povrat na baznu liniju te je ta brzina protoka korištena za daljnja mjerenja.



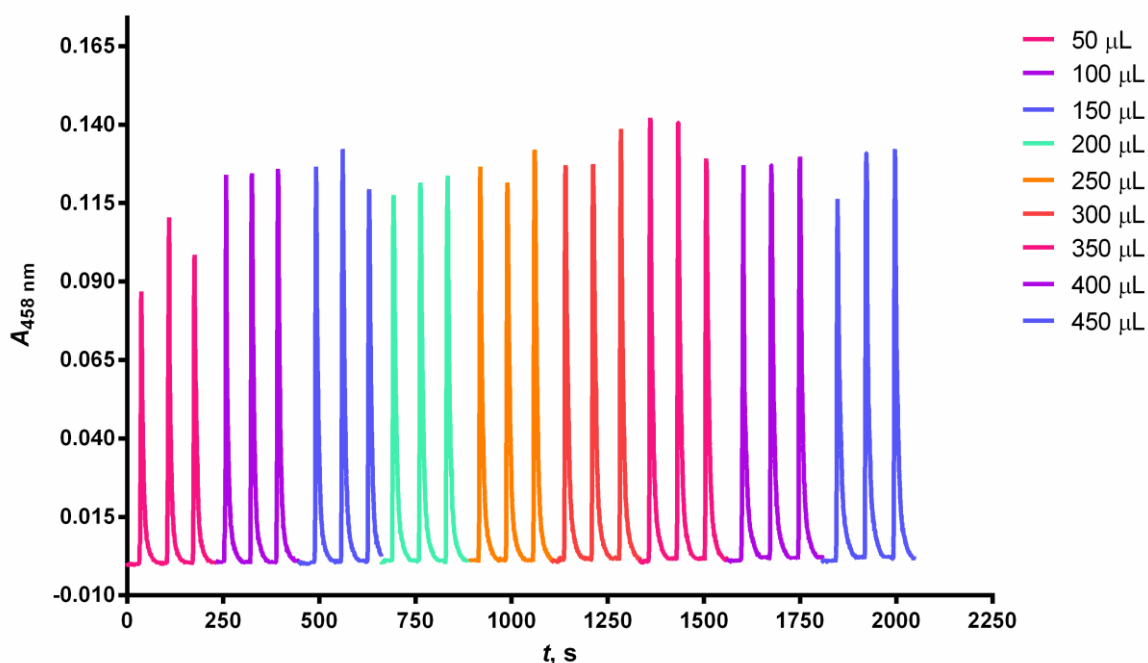
Slika 4.3. Diagram utjecaja brzine protoka osnovne otopine. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{GSH}) = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $c([\text{Cu}(\text{Nc})_2]^{2+}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 3$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, protok = $1000 \mu\text{L min}^{-1}$ - $8000 \mu\text{L min}^{-1}$, volumen petlje zadržavanja = $1000 \mu\text{L}$, duljina reakcijske petlje = 65 cm , volumen injektiranja reagensa = $200 \mu\text{L}$, volumen injektiranja analita = $200 \mu\text{L}$, volumen osnovne otopine = $3000 \mu\text{L}$, volumen protočne kivete = $80 \mu\text{L}$, $\lambda = 458 \text{ nm}$.



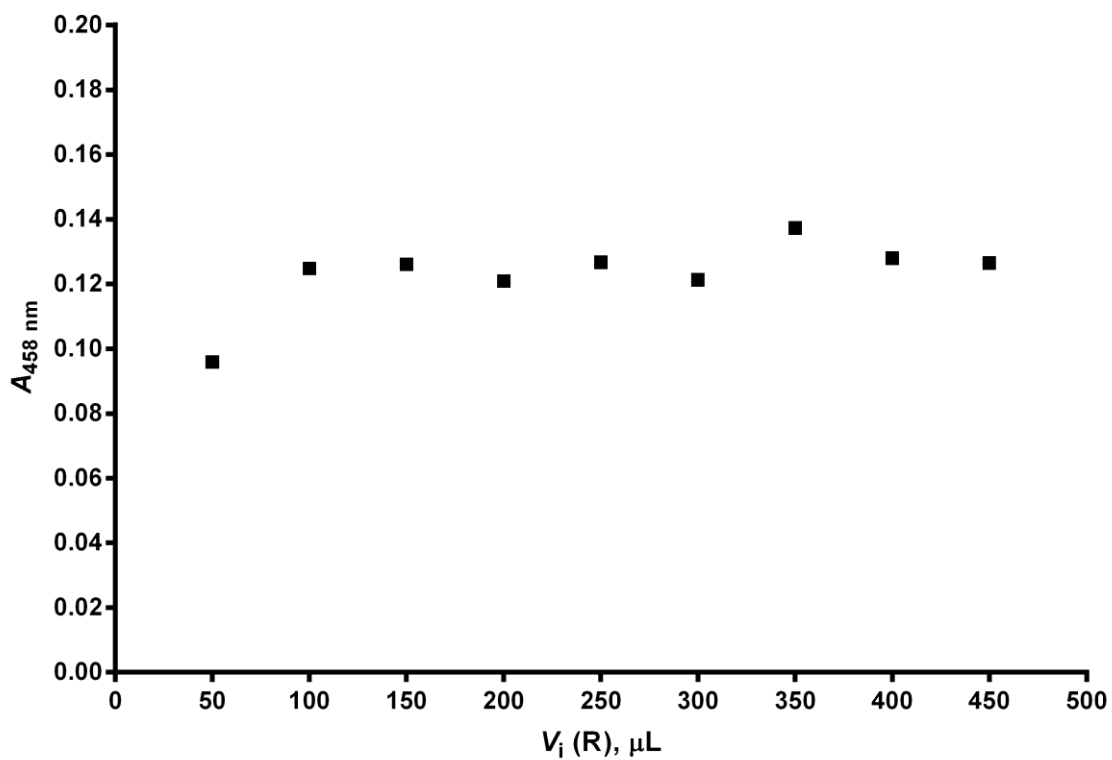
Slika 4.4. Grafički prikaz utjecaja brzine protoka osnovne otopine. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{GSH}) = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $c([\text{Cu}(\text{Nc})_2]^{2+}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 3$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, protok = $1000 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$ - $8000 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$, volumen petlje zadržavanja = $1000 \text{ } \mu\text{L}$, duljina reakcijske petlje = 65 cm , volumen injektiranja reagensa = $200 \text{ } \mu\text{l}$, volumen injektiranja analita = $200 \text{ } \mu\text{L}$, volumen osnovne otopine = $3000 \text{ } \mu\text{L}$, volumen protočne kivete = $80 \text{ } \mu\text{L}$, $\lambda = 458 \text{ nm}$.

4.3. Optimizacija volumena injektiranja reagensa

Injektiranjem optimalnog volumena reagensa ostvaruje se potpunost reakcije uz viši signal te povrat na baznu liniju. Zbog ograničene količine analita injektiranje volumena reagensa koji je veći od optimalnog ne vodi do povećanja signala. Štoviše, takvi volumeni rezultiraju većom količinom otpada i posljedično smanjenom ekonomičnošću analize. S ciljem određivanja optimalnog volumena reagensa ispitivana je visina signala u reakcijama različitih volumena reagensa u rasponu od 50 μL do 450 μL sa 200 μL analita. Nakon provedenih mjerenja odabran je volumen od 150 μL jer se uporabom tog volumena ostvaruje dovoljno visoka apsorbancija te je isti korišten u daljnjim mjerenjima.



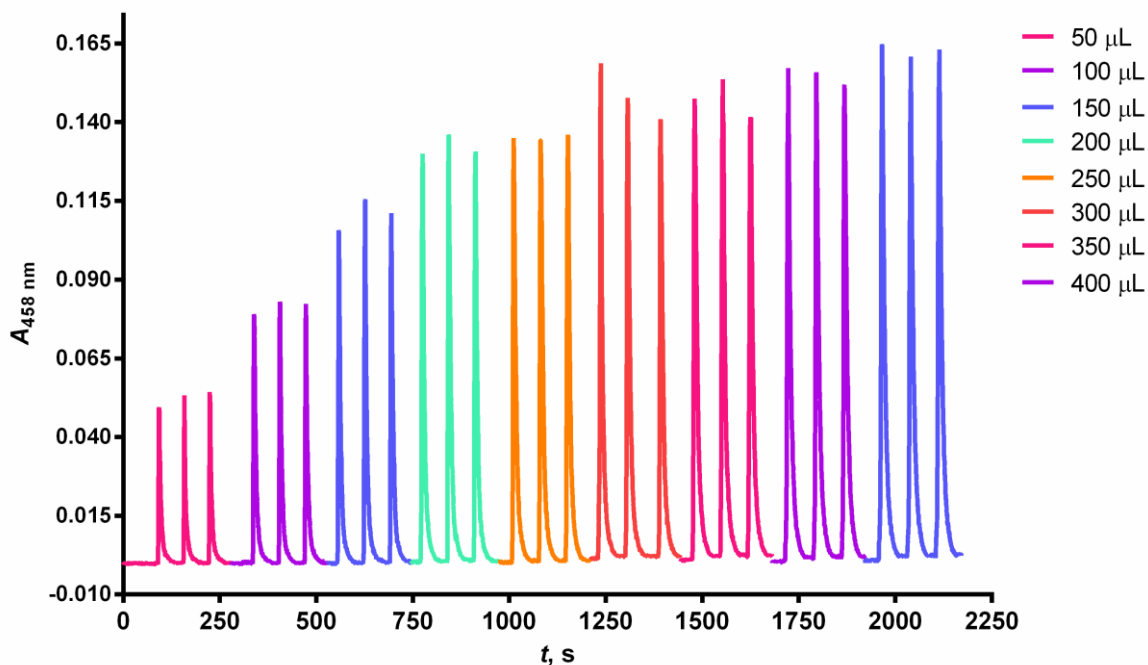
Slika 4.5. Siagram utjecaja volumena injektiranja reagensa. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{GSH}) = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $c([\text{Cu}(\text{Nc})_2]^{2+}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 3$, $t = 25^\circ\text{C}$, protok = $3000 \mu\text{L min}^{-1}$, volumen petlje zadržavanja = $1000 \mu\text{L}$, duljina reakcijske petlje = 65 cm , volumen injektiranja reagensa = $50 \mu\text{L} - 450 \mu\text{L}$, volumen injektiranja analita = $200 \mu\text{L}$, volumen osnovne otopine = $3000 \mu\text{L}$, volumen protočne kivete = $80 \mu\text{L}$, $\lambda = 458 \text{ nm}$.



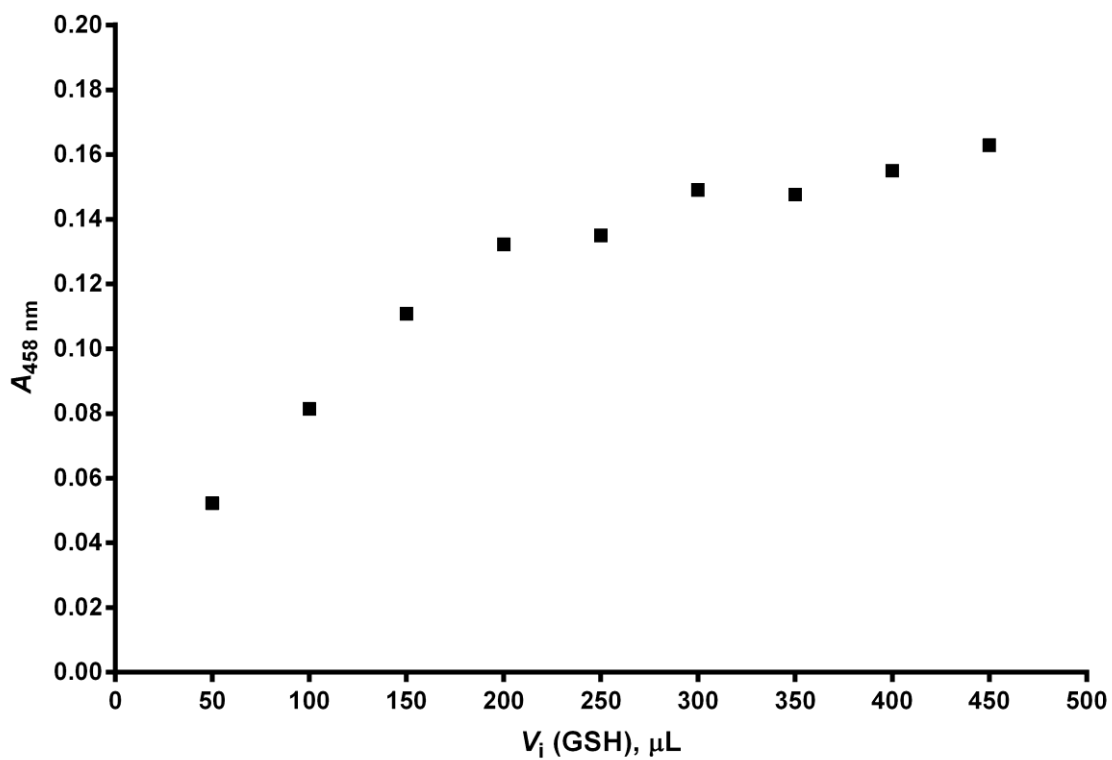
Slika 4.6. Grafički prikaz utjecaja volumena injektiranja reagensa. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{GSH}) = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $c([\text{Cu}(\text{Nc})_2]^{2+}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 3$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, protok = $3000 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$, volumen petlje zadržavanja = $1000 \text{ } \mu\text{L}$, duljina reakcijske petlje = 65 cm , volumen injektiranja reagensa = $50 \text{ } \mu\text{L} - 450 \text{ } \mu\text{L}$, volumen injektiranja analita = $200 \text{ } \mu\text{L}$, volumen osnovne otopine = $3000 \text{ } \mu\text{L}$, volumen protočne kivete = $80 \text{ } \mu\text{L}$, $\lambda = 458 \text{ nm}$.

4.4. Optimizacija volumena injektiranja analita

Porastom volumena injektiranog analita, raste i visina analitičkog signala. Prilikom odabira optimalnog volumena injektiranja analita osim o visini signala potrebno je voditi računa i o broju analiza odnosno vremenu utrošenom za pojedinu analizu te povratu na baznu liniju. Vršena su mjerenja sa volumenima analita od 50 μL do 450 μL dok je volumen reagensa prethodno optimiziran na 150 μL . Nakon provedenih mjerenja utvrđeno je kako su, na temelju iznesenih uvjeta, optimalni volumeni injektiranja od 200 μL te 250 μL . Konačno je odlučeno kako će se za daljnja mjerenja koristiti volumen analita od 200 μL radi ekonomičnosti analize.



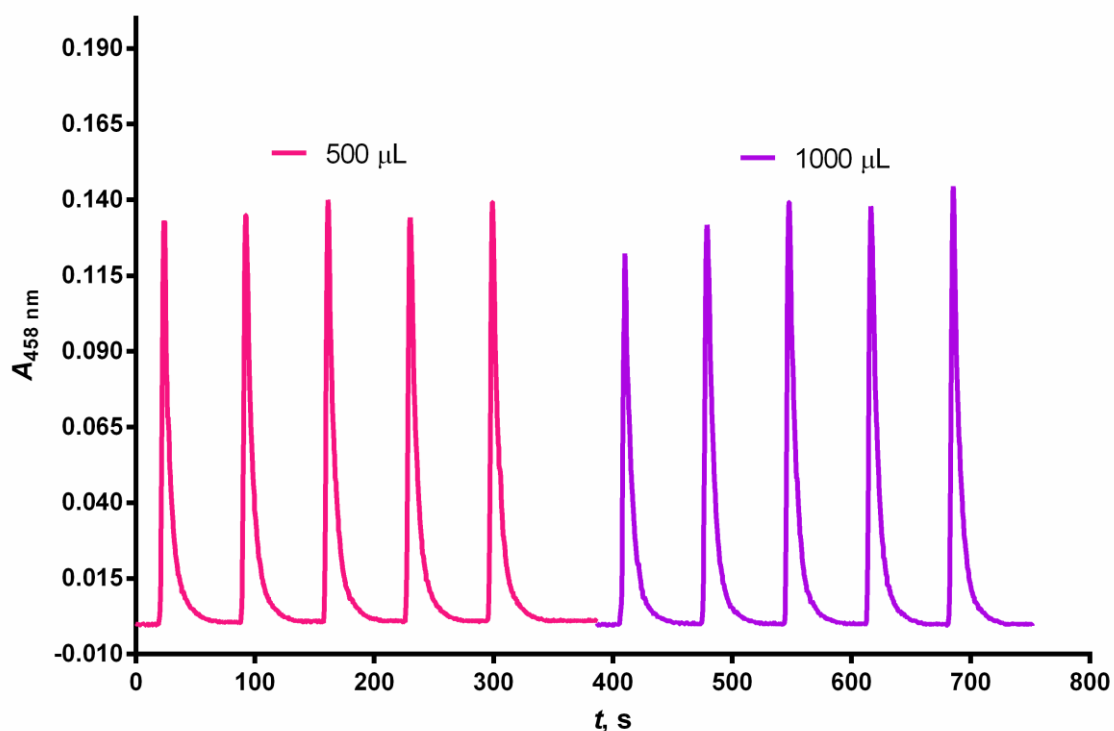
Slika 4.7. Siagram utjecaja volumena injektiranja analita. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{GSH}) = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $c([\text{Cu}(\text{Nc})_2]^{2+}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 3$, $t = 25^\circ\text{C}$, protok = $3000 \mu\text{L min}^{-1}$, volumen petlje zadržavanja = $1000 \mu\text{L}$, duljina reakcijske petlje = 65 cm , volumen injektiranja reagensa = $150 \mu\text{L}$, volumen injektiranja analita = $50 \mu\text{L} - 450 \mu\text{L}$, volumen osnovne otopine = $3000 \mu\text{L}$, volumen protočne kivete = $80 \mu\text{L}$, $\lambda = 458 \text{ nm}$.



Slika 4.8. Grafički prikaz utjecaja volumena injektiranja analita. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{GSH}) = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $c([\text{Cu}(\text{Nc})_2]^{2+}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 3$, $t = 25^\circ \text{C}$, protok = $3000 \mu\text{L min}^{-1}$, volumen petlje zadržavanja = $1000 \mu\text{L}$, duljina reakcijske petlje = 65 cm , volumen injektiranja reagensa = $150 \mu\text{L}$, volumen injektiranja analita = $50 \mu\text{L} - 450 \mu\text{L}$, volumen osnovne otopine = $3000 \mu\text{L}$, volumen protočne kivete = $80 \mu\text{L}$, $\lambda = 458 \text{ nm}$.

4.5. Optimizacija volumena petlje zadržavanja

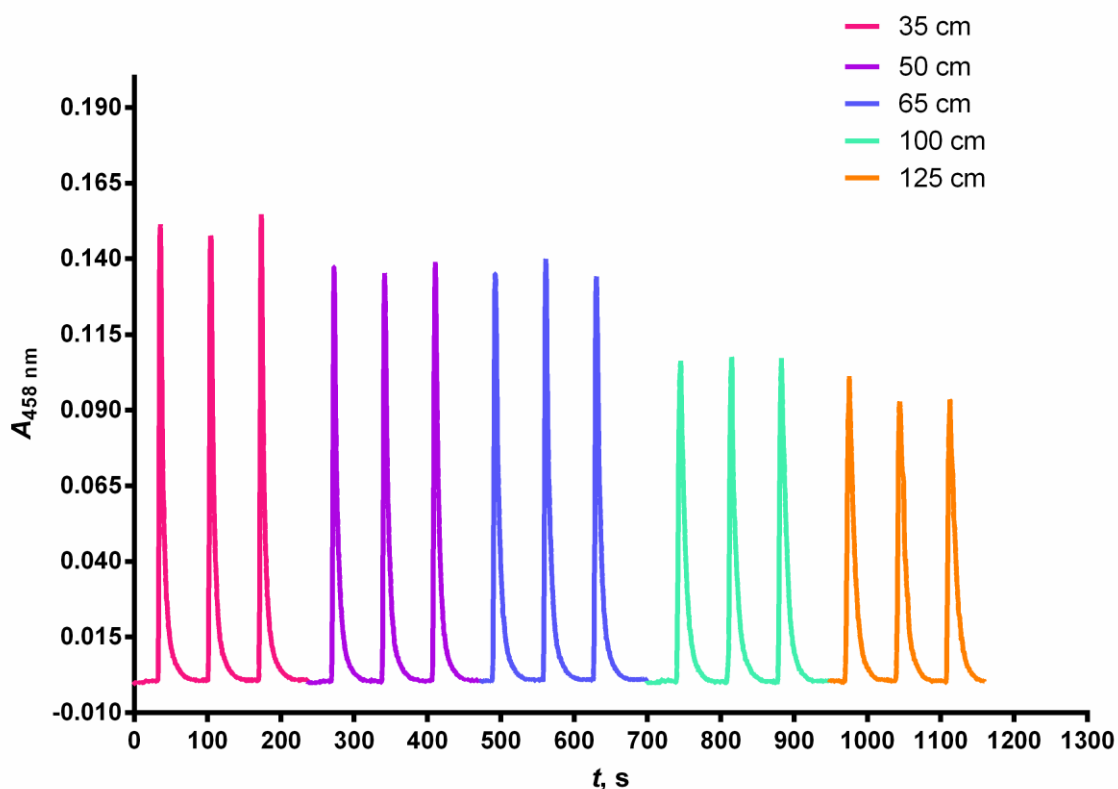
Volumen petlje zadržavanja mora biti dovoljno velik da u nju stanu optimizirani volumeni analita (200 μL) i reagensa (150 μL), a istovremeno mora omogućiti dovoljnu osjetljivost metode. Ispitane su reakcije pri volumenima petlje zadržavanja od 500 μL i 1000 μL . Budući da nije bilo značajne razlike u visini signala, za daljnja je mjerenja odabran volumen od 500 μL . Razlog tome je manji utrošak struje nosioca, odnosno otapala, te bolja ponovljivost signala.



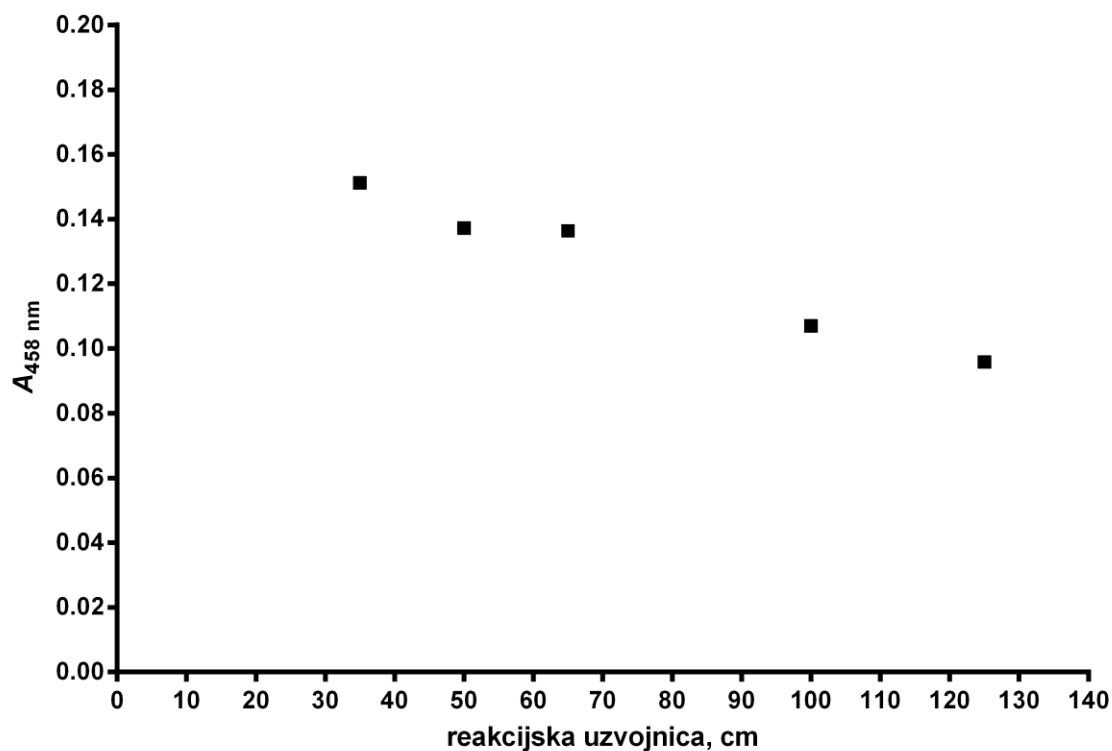
Slika 4.9. Siagram utjecaja volumena petlje zadržavanja. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{GSH}) = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $c([\text{Cu}(\text{Nc})_2]^{2+}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 3$, $t = 25^\circ\text{C}$, protok = 3000 $\mu\text{L min}^{-1}$, volumen petlje zadržavanja = 500 μL - 1000 μL , duljina reakcijske petlje = 65 cm, volumen injektiranja reagensa = 150 μL , volumen injektiranja analita = 200 μL , volumen osnovne otopine = 3000 μL , volumen protočne kivete = 80 μL , $\lambda = 458 \text{ nm}$.

4.6. Optimizacija duljine reakcijske petlje

Duljina reakcijske petlje (uzvojnice) utječe na potpunost kemijske reakcije. Ukoliko je reakcijska petlja prekratka, postoji rizik od nepotpune reakcije te slabije ponovljivosti. Preduga petlja može dovesti do smanjene koncentracije produkta uzrokovane raspršenjem. Ispitana je reakcija pri duljinama petlje u rasponu od 35 cm do 125 cm. Iako je najveći signal zabilježen pri duljini reakcijske petlje od 35 cm, ista nije odabrana kao optimalna zbog slabije ponovljivosti. Pri duljini petlje od 50 cm i 65 cm ponovljivost je dobra a jačine signala slične. Stoga je, iz ekonomičnih razloga odabrana duljina petlje od 50 cm jer ista omogućuje potpunost i ponovljivost reakcije uz manju količinu otpada.



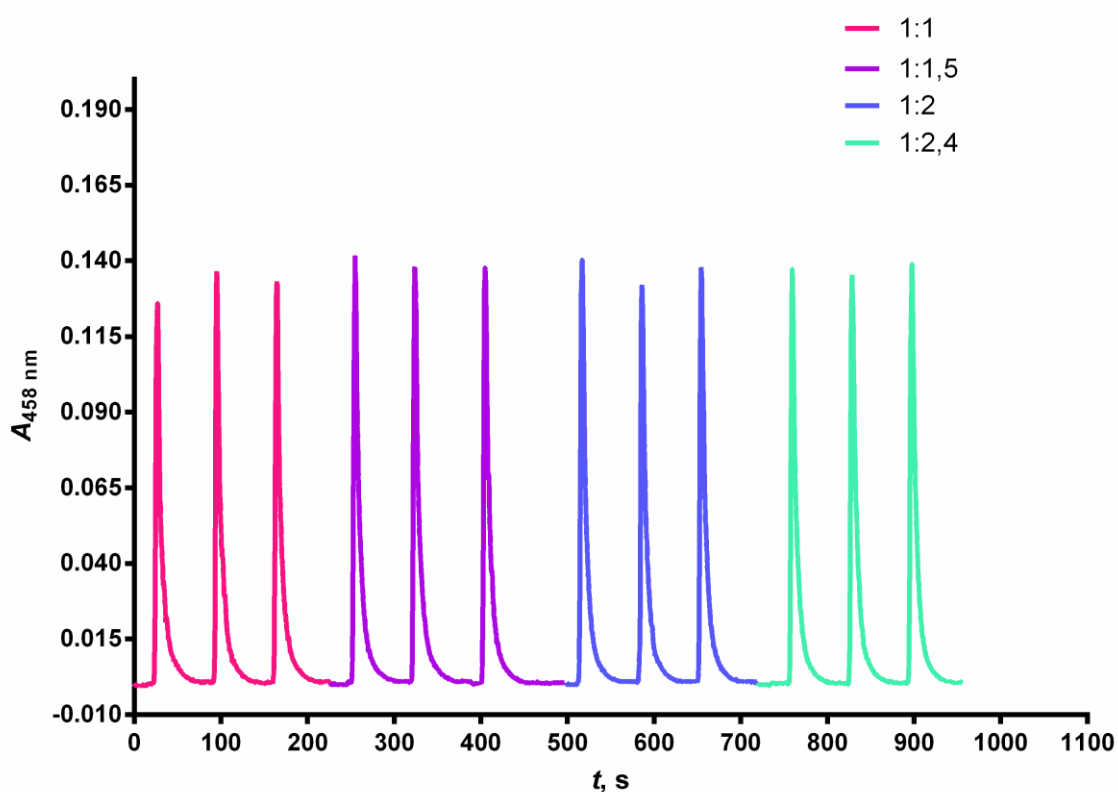
Slika 4.10. Siagram utjecaja duljine reakcijske petlje. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{GSH}) = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $c([\text{Cu}(\text{Nc})_2]^{2+}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 3$, $t = 25^\circ \text{C}$, protok = $3000 \mu\text{L min}^{-1}$, volumen petlje zadržavanja = $500 \mu\text{L}$, duljina reakcijske petlje = 35 cm - 125 cm, volumen injektiranja reagensa = $150 \mu\text{L}$, volumen injektiranja analita = $200 \mu\text{L}$, volumen osnovne otopine = $3000 \mu\text{L}$, volumen protočne kivete = $80 \mu\text{L}$, $\lambda = 458 \text{ nm}$.



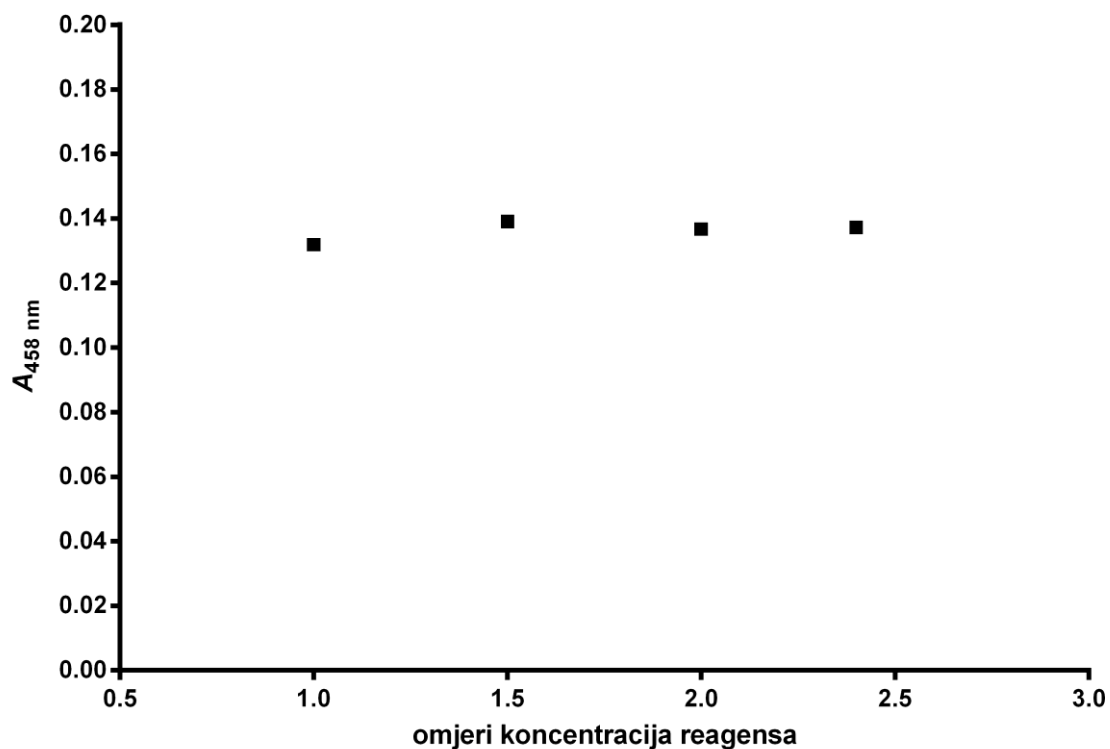
Slika 4.11. Grafički prikaz utjecaja duljine reakcijske petlje. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{GSH}) = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $c([\text{Cu}(\text{Nc})_2]^{2+}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 3$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{protok} = 3000 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$, $\text{volumen petlje zadržavanja} = 500 \text{ }\mu\text{L}$, $\text{duljina reakcijske petlje} = 35 \text{ cm} - 125 \text{ cm}$, $\text{volumen injektiranja reagensa} = 150 \text{ }\mu\text{L}$, $\text{volumen injektiranja analita} = 200 \text{ }\mu\text{L}$, $\text{volumen osnovne otopine} = 3000 \text{ }\mu\text{L}$, $\text{volumen protočne kivete} = 80 \text{ }\mu\text{L}$, $\lambda = 458 \text{ nm}$.

4.7. Odabir omjera koncentracija reagensa

Uspoređivane su reakcije različitih koncentracija dvovalentnog bakra i neokuproina. Za vrijeme ispitivanja je koncentracija bakra bila konstantna, a koncentracije neokuproina bile su u omjerima prema koncentraciji bakra od 1:1, 1:1,5, 1:2 i 1:2,4. Razlike u visini signala su bile neznatne, ali je odlučeno da će se daljnja mjerenja raditi pri omjeru od 1:2,4 radi bolje ponovljivosti rezultata.



Slika 4.12. Siagrami utjecaja omjera koncentracija reagensa. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{Cu}^{2+}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, omjeri koncentracija bakra i neokuproina: 1:1, 1:1,5, 1:2, 1:2,4, $t = 25^\circ\text{C}$, protok = $3000 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$, volumen petlje zadržavanja = $500 \text{ }\mu\text{L}$, duljina reakcijske petlje = 50 cm , volumen injektiranja reagensa = $150 \text{ }\mu\text{L}$, volumen injektiranja analita = $200 \text{ }\mu\text{L}$, volumen osnovne otopine = $3000 \text{ }\mu\text{L}$, volumen protočne kivete = $80 \text{ }\mu\text{L}$, $\lambda = 458 \text{ nm}$.



Slika 4.13. Grafički prikaz utjecaja omjera koncentracija reagensa. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{Cu}^{2+}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, omjeri koncentracija bakra i neokuproina: 1:1, 1:1,5, 1:2, 1:2,4, $t = 25^\circ\text{C}$, protok = $3000 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$, volumen petlje zadržavanja = $500 \text{ } \mu\text{L}$, duljina reakcijske petlje = 50 cm , volumen injektiranja reagensa = $150 \text{ } \mu\text{L}$, volumen injektiranja analita = $200 \text{ } \mu\text{L}$, volumen osnovne otopine = $3000 \text{ } \mu\text{L}$, volumen protočne kivete = $80 \text{ } \mu\text{L}$, $\lambda = 458 \text{ nm}$.

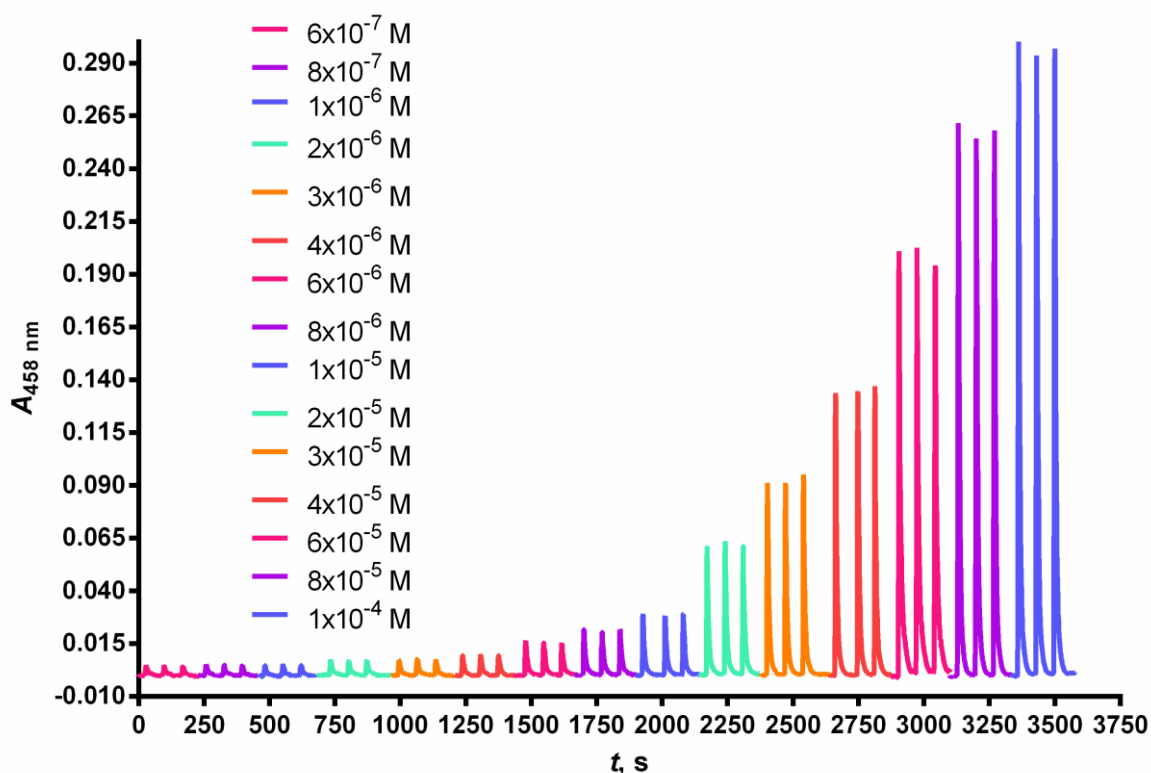
4.8. Odabrani parametri protočnog sustava

Tablica 4.1. Odabrani parametri protočnog sustava

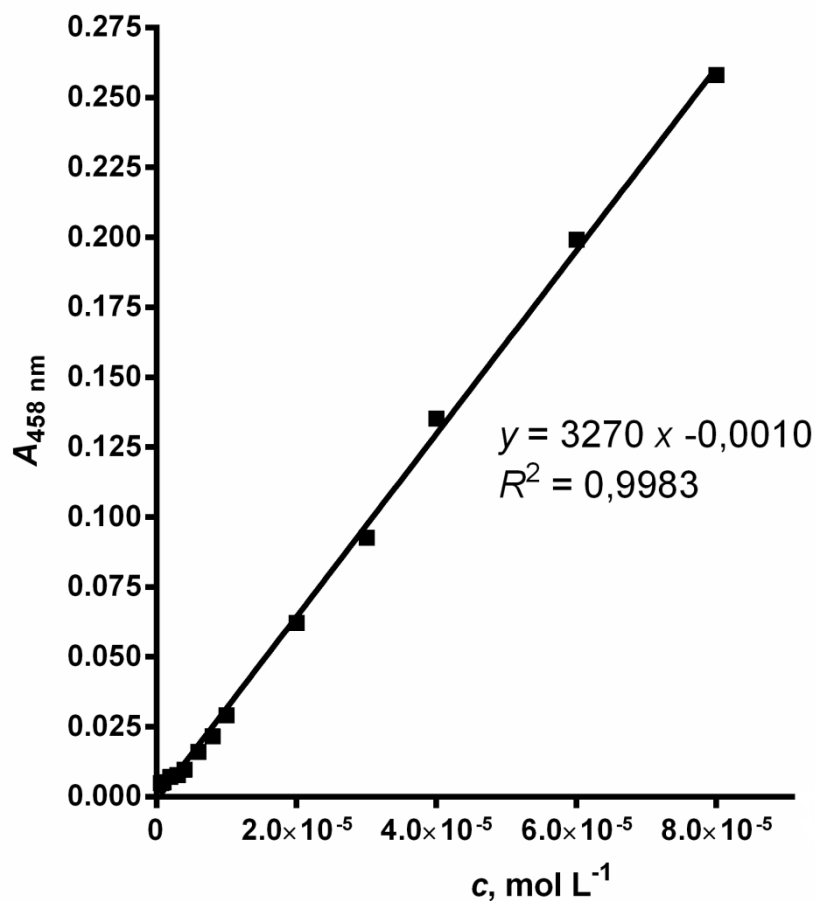
Parametar	Ispitivane vrijednosti	Odabrane vrijednosti
Omjer koncentracija bakra i neokuproina	1:1, 1:1,5, 1:2, 1:2,4	1:2,4
Brzina protoka ($\mu\text{L min}^{-1}$)	1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000	3000
Redoslijed injektiranja	R,GSH; GSH,R	R,GSH
Volumen injektiranja reagensa (μL)	50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450	150
Volumen injektiranja analita (μL)	50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400	200
Volumen petlje zadržavanja (μL)	500 i 1000	500
Duljina reakcijske petlje (cm)	35, 50, 65, 100, 125	50

4.9. Linearno dinamičko područje

Linearno dinamičko područje predstavlja raspon koncentracija unutar kojega je signal proporcionalan razlici koncentracije. Na krivulji umjeravanja to je područje prikazano kao pravac. Koristeći prethodno određene parametre, izrađena je krivulja umjeravanja za 15 različitih koncentracija analita u rasponu od $6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ do $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Za ovu je metodu izmjereno linearno dinamičko područje u rasponu od $6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ do $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Jednadžba pravca glasi $y = 3270 x - 0,0010$ gdje je y apsorbancija, a x koncentracija glutationa. Koeficijent linearne regresije (R^2) iznosi 0,9983.



Slika 4.14. Siagram krivulje umjeravanja za spektrofotometrijsko određivanje GSH. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{GSH}) = 6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1} - 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $c([\text{Cu}(\text{Nc})_2]^{2+}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 3$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, protok = $3000 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$, volumen petlje zadržavanja = $500 \text{ } \mu\text{L}$, duljina reakcijske petlje = $35 \text{ cm} - 125 \text{ cm}$, volumen injektiranja reagensa = $150 \text{ } \mu\text{L}$, volumen injektiranja analita = $200 \text{ } \mu\text{L}$, volumen osnovne otopine = $3000 \text{ } \mu\text{L}$, volumen protočne kivete = $80 \text{ } \mu\text{L}$, $\lambda = 458 \text{ nm}$.



Slika 4.15. Grafički prikaz linearnog dinamičkog područja spektrofotometrijskog određivanja GSH. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{GSH}) = 6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1} - 8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $c([\text{Cu}(\text{Nc})_2]^{2+}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 3$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{protok} = 3000 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$, $\text{volumen petlje zadržavanja} = 500 \text{ } \mu\text{L}$, $\text{duljina reakcijske petlje} = 35 \text{ cm} - 125 \text{ cm}$, $\text{volumen injektiranja reagensa} = 150 \text{ } \mu\text{L}$, $\text{volumen injektiranja analita} = 200 \text{ } \mu\text{L}$, $\text{volumen osnovne otopine} = 3000 \text{ } \mu\text{L}$, $\text{volumen protočne kivete} = 80 \text{ } \mu\text{L}$, $\lambda = 458 \text{ nm}$.

4.10. Granica dokazivanja i granica određivanja

Granica dokazivanja (eng. *Limit of detection*, LOD) je najmanja količina analita u uzorku koja se može kvalitativno odrediti. Računa se prema sljedećem izrazu:

$$D_L = \frac{3 \times s_b}{m} \quad (4-1)$$

gdje je s_b standardna devijacija slijepe probe, a m nagib krivulje umjeravanja.

Granica određivanja (eng. *Limit of quantification*, LOQ) je najmanja količina analita u uzorku koja se može odrediti uz odgovarajuću preciznost i točnost. Računa se prema sljedećem izrazu:

$$Q_L = \frac{10 \times s_b}{m} \quad (4-2)$$

gdje je s_b standardna devijacija slijepe probe, a m nagib krivulje umjeravanja.

Standardna devijacija slijepe probe kod provedenih je mjerenja iznosila 0,0002, a nagib krivulje 3270. Temeljem jednadžbi izračunate su granica dokazivanja koja iznosi $2,20 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ i granica određivanja koja iznosi $6,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

4.11. Vrednovanje metode

U postupku vrednovanja ispitani su: utjecaj interferencija, ponovljivost i točnost metode. Korištene su vrijednosti parametara utvrđene optimizacijom.

4.11.1. Utjecaj interferencija

Utjecaj stranih tvari na jačinu signala ispitivan je pri koncentraciji glutatona od $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Pripravljene su otopine tvari koje bi mogle interferirati prilikom određivanja analita (GSH). Početne koncentracije tvari bile su 500 puta veće od koncentracije glutatona s izuzetkom acetilsalicilne kiseline koja je pripremljena u jednakoj koncentraciji kao i glutation. Pri izračunavanju relativne pogreške koristila se prethodno izmjerena apsorbancija otopine glutatona koja je iznosila 0,1455.

Relativna pogreška izračunata je prema sljedećem izrazu:

$$\text{Relativna pogreška (\%)} = \frac{\bar{A}_{\text{interferencije}} - \bar{A}_{\text{GSH}}}{\bar{A}_{\text{GSH}}} \times 100 \quad (4-3)$$

Tablica 4.2. Interferirajuće tvari i relativne pogreške

Interferirajuća tvar	Omjer koncentracija (glutation : interferirajuća tvar)	Relativna pogreška
glukoza	1:500	2,96 %
fruktoza	1:500	1,80 %
kalijev nitrat	1:500	3,51 %
borna kiselina	1:500	1,86 %
laktoza	1:500	1,24 %
natrijev sulfat	1:500	3,83 %
limunska kiselina	1:500	74,55 %
vinska kiselina	1:500	16,20 %
acetilsalicilna kiselina	1:1	55,81 %

Za one tvari koje su pokazale relativnu pogrešku veću od 5 % (tablica 4.2) mjerenja su ponovljena u manjim koncentracijama. Unatoč smanjenju koncentracija, one su i dalje bile znatno veće od onih koje su prisutne u farmaceutskim pripravcima.

Tablica 4.3. Interferirajuće tvari u manjoj koncentraciji i relativne pogreške

Interferirajuća tvar	Omjer koncentracija (glutation : interferirajuća tvar)	Relativna pogreška
limunska kiselina	1:100	47,56 %
limunska kiselina	1:10	42,25 %
vinska kiselina	1:10	43,57 %
natrijev citrat	1:100	6,9 %

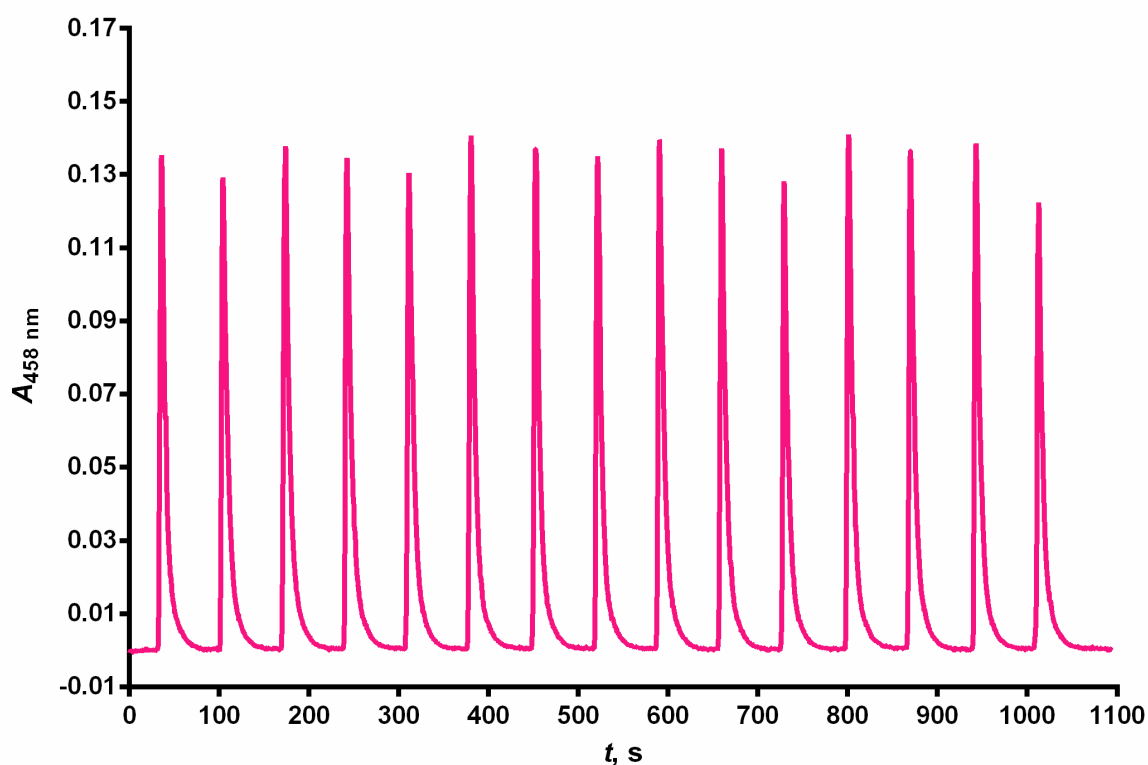
Budući da su i manje koncentracije pokazale pogrešku veću od prihvatljive, mjerenja su provedena pri višoj pH vrijednosti (pH = 5). S obzirom da se radilo o kiselinama i njihovim solima, pretpostavljeno je da će stupanj ionizacije utjecati na njihovu interferenciju sa metodom. Međutim, relativna pogreška je i dalje bila veća od 5 %. Zaključeno je da limunska kiselina, acetilsalicilna kiselina, vinska kiselina i natrijev citrat interferiraju prilikom određivanja glutaciona razvijenom metodom.

Tablica 4.4. Interferirajuće tvari pri pH = 5

Interferirajuća tvar	Omjer koncentracija (glutation : interferirajuća tvar)	Relativna pogreška
natrijev citrat	1:100	28,47 %
natrijev citrat	1:5	5,56 %
limunska kiselina	1:10	47,86 %
limunska kiselina	1:5	7,82 %
vinska kiselina	1:10	62,32 %

4.11.2. Ponovljivost

Ponovljivost metode podrazumijeva slaganje rezultata ostvarenih pri istim uvjetima mjerenja (uzorak, analitičar, mjerni sustav, radni uvjeti) u kratkom vremenskom razdoblju. Pri utvrđivanju ponovljivosti ove metode ispitano je 15 uzoraka standardne otopine glutationa koncentracije $c(\text{GSH}) = 4 \times 10^{-5}$. Temeljem izmjerenih apsorbancija izračunato je relativno standardno odstupanje (engl. *Relative standard deviation*, RSD) $\text{RSD} = 3,80 \%$. Dobiveni rezultati upućuju na ponovljivost metode.



Slika 4.16. Siagram ponovljivosti optimizirane metode. Eksperimentalni uvjeti: $c(\text{GSH}) = 4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $c([\text{Cu}(\text{Nc})_2]^{2+}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 3$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, protok = $3000 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$, volumen petlje zadržavanja = $500 \text{ } \mu\text{L}$, duljina reakcijske petlje = 50 cm , volumen injektiranja reagensa = $150 \text{ } \mu\text{L}$, volumen injektiranja analita = $200 \text{ } \mu\text{L}$, volumen osnovne otopine = $3000 \text{ } \mu\text{L}$, volumen protočne kivete = $80 \text{ } \mu\text{L}$, $\lambda = 458 \text{ nm}$.

4.11.3. Iskoristivost metode

Iskoristivost metode ujedno upućuje i na njenu točnost. Iskoristivost iskazuje sposobnost metode da izmjeri poznatu količinu supstance. Kod validacije metode iskoristivost je određivana mjerenjem šest radnih otopina pripremljenih dodavanjem određenog volumena standardne otopine otopini uzorka. Koncentracija standardne otopine iznosila je $6,51 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, a koncentracija otopine uzorka glutaciona bila je $3,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Radna otopina A_{mix} pripravljena je dodavanjem alikvota otopine realnog uzorka od 1 mL i u odmjernu tikvicu od 10 mL nakon čega je do oznake napunjeno deioniziranom vodom. Koncentracija otopine iznosi $3,25 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

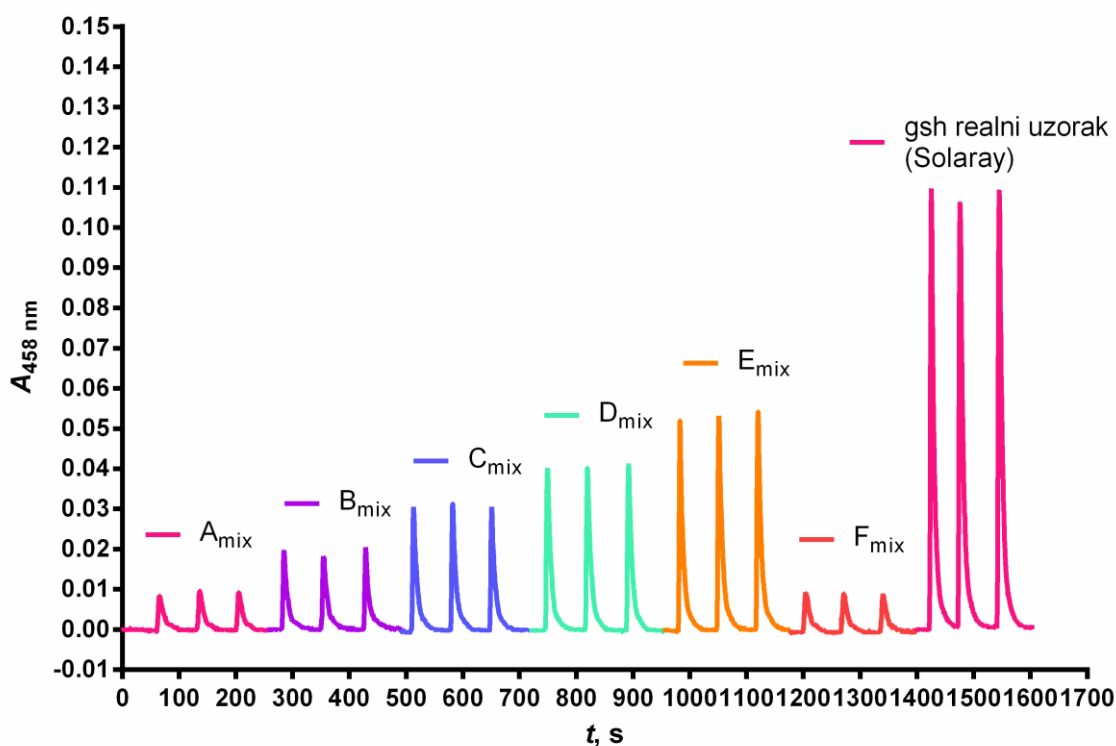
Radna otopina B_{mix} pripravljena je dodavanjem alikvota otopine realnog uzorka od 1 mL i standardne otopine od 0,5 mL u odmjernu tikvicu volumena 10 mL nakon čega je do oznake nadopunjeno deioniziranom vodom. Koncentracija otopine iznosi $6,51 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Radna otopina C_{mix} pripravljena je dodavanjem alikvota otopine realnog uzorka volumena 1 mL te isto toliko standardne otopine u odmjernu tikvicu volumena 10 mL nakon čega je do oznake nadopunjeno deioniziranom vodom. Koncentracija otopine iznosi $9,76 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Radna otopina D_{mix} pripravljena je dodavanjem alikvota otopine realnog uzorka od 1 mL te alikvota standardne otopine od 1,5 mL u odmjernu tikvicu volumena 10 mL nakon čega je do oznake nadopunjeno deioniziranom vodom. Koncentracija otopine iznosi $1,63 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Radna otopina E_{mix} pripravljena je dodavanjem alikvota otopine realnog uzorka 1 mL i standardne otopine 2 mL u odmjernu tikvicu volumena 10 mL nakon čega je do oznake nadopunjeno deioniziranom vodom. Koncentracija otopine iznosi $1,30 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Radna otopina F_{mix} pripravljena je dodavanjem alikvota standardne otopine od 0,5 mL u odmjernu tikvicu volumena 10 mL nakon čega je do oznake nadopunjeno deioniziranom vodom. Koncentracija otopine iznosi $3,26 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.



Slika 4.17. Siagram ispitivanja točnosti i analize realnog uzorka. Eksperimentalni uvjeti: $c([\text{Cu}(\text{Nc})_2]^{2+}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 3$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{protok} = 3000 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$, $\text{volumen petlje zadržavanja} = 500 \text{ } \mu\text{L}$, $\text{duljina reakcijske petlje} = 50 \text{ cm}$, $\text{volumen injektiranja reagensa} = 150 \text{ } \mu\text{L}$, $\text{volumen injektiranja analita} = 200 \text{ } \mu\text{L}$, $\text{volumen osnovne otopine} = 3000 \text{ } \mu\text{L}$, $\text{volumen protočne kivete} = 80 \text{ } \mu\text{L}$, $\lambda = 458 \text{ nm}$.

Usporedba izmjerenih i teoretskih koncentracija prikazana je u tablici u nastavku:

Tablica 4.5. Usporedba izmjerenih i teoretskih koncentracija

Uzorak:	\bar{A}	$C_{\text{eksperimentalna}}, \text{ mol L}^{-1}$	$C_{\text{teoretska}}, \text{ mol L}^{-1}$	%
A_{mix}	0,0091	$3,09 \times 10^{-6}$	$3,25 \times 10^{-6}$	94,91
B_{mix}	0,0195	$6,28 \times 10^{-6}$	$6,51 \times 10^{-6}$	96,45
C_{mix}	0,0309	$9,74 \times 10^{-6}$	$9,76 \times 10^{-6}$	99,84
D_{mix}	0,0406	$1,27 \times 10^{-5}$	$1,30 \times 10^{-5}$	97,85
E_{mix}	0,0531	$1,66 \times 10^{-5}$	$1,63 \times 10^{-5}$	101,56
F_{mix}	0,0092	$3,11 \times 10^{-6}$	$3,25 \times 10^{-6}$	95,54

Navedene vrijednosti ukazuju na iskoristivost metode.

4.12. Analiza realnog uzorka

Optimizirana metoda korištena je za analizu realnog uzorka kapsule glutaciona. Deklarirani sadržaj glutaciona u jednoj kapsuli iznosio je 50 mg.

Tablica 4.6. Rezultati analize realnog uzorka

Uzorak	A
1.	0,1134
2.	0,1064
3.	0,1094

Iz navedenih vrijednosti proizlazi da središnja vrijednost apsorbancije (\bar{A}) iznosi 0,1097.

Uvrštavanjem dobivene vrijednosti u jednadžbu pravca ($y = 3270 x - 0,001$), gdje x predstavlja koncentraciju, a y apsorbanciju, izračunana koncentracija glutaciona u uzorku iznosi $3,39 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Iz dobivene koncentracije može se izračunati koncentracija u otopini uzorka volumena 500 mL.

$$c_1 = 3,39 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$$

$$V_1 = 10 \text{ mL} = 0,01 \text{ L}$$

$$V_2 = 1 \text{ mL} = 0,001 \text{ L}$$

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

$$c_2 = \frac{3,39 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \times 0,01 \text{ L}}{0,001 \text{ L}}$$

$$c_2 = 3,39 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

$$V = 500 \text{ mL} = 0,5 \text{ L}$$

$$c = \frac{n}{V} \Rightarrow n = c \times V$$

$$n = \frac{m}{M} \Rightarrow m = c \times V \times M$$

$$m = 3,39 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \times 307,32 \text{ g mol}^{-1} \times 0,5 \text{ L} = 0,0520 \text{ g} = 52,00 \text{ mg}$$

4.13. Određivanje glutaciona metodom koju propisuje farmakopeja

Europska farmakopeja preporučuje jodometrijsku titraciju kao metodu za određivanje sadržaja glutaciona u dodacima prehrani [24].

Jod se koristi kao standardna otopina za određivanje nekih reducirajućih tvari. Nizak standardni potencijal joda ograničava njegovu primjenu kod određenih redoks titracija.

Prema protokolu koji propisuje farmakopeja glutacion se određuje tako da se 0,5 g uzorka i 2 g kalijevog jodida otopi u 50 mL deionizirane vode. Nakon hlađenja doda se 10 mL razrijeđene klorovodične kiseline i 20 mL kalijevog jodida. Pripravljena se smjesa ostavi u mraku 15 minuta te se titrira sa 0,05 mol L⁻¹ otopinom natrijeva tiosulfata. Kao indikator se dodaje 1 mL otopine škroba [24].

Metoda se zasniva na redoks titraciji u kojoj glutacion reducira jod u jodid:



pri čemu 30,37 mg GSH odgovara 1 mL 0,05 mol L⁻¹ otopine joda.

Standardizacijom pripravljene otopine joda izračunato je da njezina koncentracija iznosi 0,0467 mol L⁻¹. Utrošak otopine navedene koncentracije koja odgovara 30,37 mg GSH izračunat je prema sljedećem izrazu:

$$c(\text{I}_2)_{\text{teoretska}} \times V(\text{I}_2)_{\text{teoretska}} = c(\text{I}_2)_{\text{eksperimentalna}} \times V(\text{I}_2)_{\text{eksperimentalna}}$$

Iz navedenog proizlazi kako 1,07 mL otopine joda koncentracije 0,0467 mol L⁻¹ odgovara 30,37 mg GSH.

Temeljem rezultata analize realnog uzorka izračunat je volumen utrošenog joda koji je iznosio 2,91 mL. Iz navedenog proizlazi kako je u analiziranom uzorku prisutno 82,60 mg GSH. Uzevši u obzir masu uzorka od 0,5 g i prosječnu masu kapsule bez ovojnice od 0,3079 g može se izračunati sadržaj glutaciona u jednoj kapsuli.

$$m(\text{GSH})_{\text{kapsula}} = \frac{m_{\text{kapsula}}}{m_{\text{uzorak}}} \times m(\text{GSH}) = \frac{0,3079 \text{ g}}{0,5000 \text{ g}} \times 82,60 \text{ mg} = 50,86 \text{ mg}$$

Tablica 4.7. Usporedba rezultata dvaju metoda

Uzorak	Deklarirana količina	Optimizirana SIA metoda	Standardna metoda prema farmakopeji
L-glutation kapsule	50 mg	52,00 mg	50,86 mg

5. Rasprava

Prilikom izrade ovoga rada provedena je optimizacija i vrednovanje metode za određivanje glutaciona slijednom analizom injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor. Metoda je iskorištena za analizu dodatka prehrani na bazi glutaciona.

S ciljem optimizacije metode ispitani su sljedeći parametri protočnog sustava: redoslijed injektiranja, brzina protoka osnovne otopine, volumen injektiranja analita, volumen injektiranja reagensa, volumen petlje zadržavanja te volumen reakcijske petlje.

Metoda se temelji na reakciji u kojoj L-glutation sudjeluje kao reducens u reakciji sa kompleksom Cu(II)-neokuproin. Redukcijom ovog spoja zelene boje nastaje kompleks Cu(I)-neokuproin koji je narančaste boje.

Optimalnim redoslijedom injektiranja prvo se injektira otopina reagensa, a potom otopina analita (L-glutation) jer je kod takvog redoslijeda zabilježen viši signal.

Brzina protoka optimizirana je s ciljem osiguravanja potpunosti reakcije te ostvarene učestalosti analiza. Ispitivane su brzine protoka u rasponu od $1000 \mu\text{L min}^{-1}$ do $8000 \mu\text{L min}^{-1}$. Kao optimalna izabrana je brzina protoka od $3000 \mu\text{L min}^{-1}$. Iako i veće brzine pokazuju slične jačine signala, kod spomenute se brzine ostvaruje dobra ponovljivost.

U sljedećem je koraku optimiziran volumen injektiranja reagensa. Ispitivani su volumeni u rasponu od $50 \mu\text{L}$ do $450 \mu\text{L}$. Uzimajući u obzir visine signala odabran je volumen od $150 \mu\text{L}$. Veći volumeni reagensa nisu davali viši signal pa je odabrana opcija u kojoj je najmanja potrošnja reagensa.

Prilikom određivanja volumena injektiranja analita ispitivane su otopine analita volumena od $50 \mu\text{L}$ do $450 \mu\text{L}$. Optimalna visina signala i ponovljivost uočene su kod volumena od $200 \mu\text{L}$ koji je odabran kao parametar metode. Veći volumeni vodili su povećanoj potrošnji analita te produljenom vremenu analize uz slabiji povrat na baznu liniju.

Uspoređeni su utjecaji volumena petlje zadržavanja. Imajući u vidu prethodno odabrane volumene injektiranja analita i reagensa ispitani su volumeni od $500 \mu\text{L}$ i $1000 \mu\text{L}$. Signali su bili gotovo jednaki pa je radi potencijalno manje količine otpada odabran volumen od $500 \mu\text{L}$.

Duljina reakcijske petlje optimizirana je koristeći se petljama duljine u rasponu od 35 cm do 125 cm. Iako je ostvaren viši signal kod petlje duljine 35 cm, ipak je odabrana duljina od 50 cm radi bolje ponovljivosti i smanjenja rizika od nepotpune reakcije.

Omjer koncentracija bakra i neokuproina iznosio je 1:2,4. Taj je omjer prvotno odabran temeljen ranijih istraživanja, a naknadno je potvrđen kao optimalan.

Koristeći odabrane parametre određeno je linearno dinamičko područje za ovu metodu. Temeljem rezultata mjerenja za 15 otopina u rasponu koncentracija od $6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ do $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ utvrđeno je linearno dinamičko područje u rasponu od $6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ do $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Jednadžba pravca glasi $y = 3270 x - 0,001$ a koeficijent linearne regresije iznosi 0,9983.

Ispitan je utjecaj interferencija u koncentraciji 500 puta većoj od koncentracije analita (omjer 1:500). Relativna pogreška ograničena je na 5 %. Relativna pogreška bila je manja od 5 % kod sljedećih spojeva: glukoza, fruktoza, kalijev nitrat, borna kiselina i natrijev sulfat. Tvari koje su pokazale pogrešku veću od 5 % podvrgnute su ponovnom ispitivanju pri manjim koncentracijama te pri promjenjenoj pH vrijednosti. Utvrđene su interferencije sa limunskom kiselinom (omjer 1:5), vinskom kiselinom (omjer 1:10), acetilsalicilnom kiselinom (omjer 1:1) te natrijevim citratom (omjer 1:5).

Točnost metode ispitivana je mjerenjem apsorbancije šest različitih otopina sa poznatim sadržajem glutaciona. Otopine su pripravljene miješanjem otopine realnog uzorka (kapsule L-glutaciona) i standardne otopine glutaciona u različitim omjerima. Iz izmjerenih apsorbancija izračunate su koncentracije otopina i uspoređene su sa prethodno izračunatim teoretskim koncentracijama. Odstupanja su bila u prihvatljivim granicama što ukazuje na točnost metode.

Konačno je metoda primjenjena za određivanje sadržaja glutaciona u tabletama za koje deklarirana količina glutaciona iznosi 50 mg. Mjerenjem je utvrđena količina glutaciona od 52 mg po kapsuli. Metodom određivanja sadržaja glutaciona prema farmakopeji izmjerena je količina od 50,86 mg glutaciona u pojedinoj kapsuli.

6. Zaključak

Zadatak ovog rada bio je optimizacija i vrednovanje metode određivanja L-glutathiona slijednom analizom injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor. Analiza je zasnovana na redoks-reakciji u kojoj glutathion svojom tiolnom skupinom reducira kompleks Cu(II)-neokuproin u Cu(I)-neokuproin. Nastali kompleks postiže apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini $\lambda = 458$ nm. Promjena u oksidacijskom stupnju bakra ogleda se promjenom boje otopine iz zelene u narančastu.

Kako bi se pojednostavnila izvedba eksperimentalnog dijela, mjerenja su provedena pri temperaturi 25 °C. Budući da je glutathion kao tiolni spoj stabilniji na nižim pH vrijednostima, mjerenja su se provodila pri pH = 3 što je postignuto uporabom acetatno-borarno-fosfatnog pufera. Navedena temperatura i pH vrijednost su odabrane temeljem rezultata prethodnih mjerenja. Izuzetak su bila ispitivanja dijela interferencija koja su provedena pri pH = 5 radi ispitivanja utjecaja stupnja ioniziranosti određenih spojeva na interferencije. Molarni omjer reaktanata, dvovalentnog bakra i neokuproina, iznosio je 1:2,4.

Optimizirani su sljedeći parametri: redoslijed injektiranja (R, GSH), brzina protoka osnovne otopine ($3000 \mu\text{L min}^{-1}$), volumen injektiranja reagensa ($150 \mu\text{L}$), volumen injektiranja analita ($200 \mu\text{L}$), volumen petlje zadržavanja ($500 \mu\text{L}$) i duljina reakcijske uzvojnice (50 cm).

Tako optimizirana metoda korištena je za mjerenje 15 uzoraka poznate koncentracije s ciljem utvrđivanja linearnog dinamičkog područja (LDP). Linearno dinamičko područje utvrđeno je u rasponu koncentracija od $6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ do $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Određeni su jednadžba pravca ($y = 3270 x - 0,001$) te koeficijent linearne regresije ($R^2 = 0,9983$). Pomoću navedenih podataka i standardne devijacije izračunate su granica dokazivanja ($\text{LOD} = 2,20 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) i granica određivanja ($\text{LOQ} = 6,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$).

Utvrđene su interferencije acetilsalicilne kiseline, limunske kiseline, natrijeva citrata i vinske kiseline. Pripravom sintetskih otopina uzorka i standarda utvrđena je točnost metode.

Zaključno, analizom realnog uzorka i usporedbom rezultata sa analizom standardnom metodom prema farmakopeji dokazana je prikladnost razvijene SIA metode za upotrebu.

7. Popis citirane literature

- [1] National Center for Biotechnology Information [Internet]. PubChem Compound Database; CID=124886 [pristupljeno 20.08.2017.]. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/124886>
- [2] FabriChem, Inc. [slika s Interneta]. L-Glutathione Reduced (NutriGlo®) [pristupljeno 15.9.2017.]. Dostupno na: <https://fabricheminc.com/cosmetic-oral-care-ingredients/l-glutathione-nutriglo/>
- [3] Van Bladeren PJ. Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2000 Dec 1;129(1-2):61-76 [pristupljeno 21.08.2017.]. Dostupno na: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279700002143?via%3Dihub>
- [4] Ferguson G, Bridge W. Glutamate cysteine ligase and the age-related decline in cellular glutathione: The therapeutic potential of γ -glutamylcysteine. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2016 Mar 1;593:12-23 [pristupljeno 22.08.2017.]. Dostupno na: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986116300170?via%3Dihub>
- [5] Shelly C. Lu. Glutathione synthesis. *Biochim biophys act* [Internet]. 2013 May;1830(5):3143-3153 [pristupljeno 22.08.2017.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3549305/>
- [6] Anderson ME, Luo JL. Glutathione therapy: from prodrugs to genes. *Semin Liver Dis* [Internet]. 1998;18(4):415-24 [pristupljeno 22.08.2017.]. Dostupno na: <https://www.thieme-connect.com/DOI/DOI?10.1055/s-2007-1007174>
- [7] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biokemija*. Zagreb: Školska knjiga; 2013.
- [8] Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. *Harperova ilustrirana biokemija*. 28. izd. Zagreb: Medicinska naklada 2011.
- [9] Smeyene M, Smeyene RJ. Glutathione Metabolsim and Parkinson's Disease. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2013 Sep; 62: 13-25 [pristupljeno 22.08.2017.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3736736/>

- [10] Richie JP, Jr, Nichenametla S, Neidig W, Calcagnotto A, Haley JS, Schell TD i sur. Randomized controlled trial of oral glutathione supplementation on body stores of glutathione. *European J Nutr* [Internet]. 2015 Mar;54(2):251-63 [pristupljeno 21.08.2017]. Dostupno na: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00394-014-0706-z>
- [11] De Bruyne E, Ducatelle R, Foss D, Sanchez M, Joosten M, Zhang G. Oral glutathione supplementation drastically reduces *Helicobacter*-induced gastric pathologies. *Sci Rep* [Internet]. 2016; 6: 20169 [pristupljeno: 21.08.2017.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4735851/>
- [12] Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem* [Internet]. 2009. Mar; 390(3): 191-214 [pristupljeno 22.08.2017.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2756154/> DOI: 10.1515/BC.2009.033.
- [13] Herzenberg LA, De Rosa SC, Dubs JG, Roederer M, Anderson MT, Ela SW i sur. Glutathione deficiency is associated with impaired survival in HIV disease. *Proc the Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1997 Mar 4; 94(5): 1967–1972 [pristupljeno: 22.08.2017.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC20026/>
- [14] Rendić S, Medić-Šarić M. Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika. Zagreb: Medicinska naklada, 2013.
- [15] Radić Nj, Kukoč Modun L. Uvod u analitičku kemiju. Zagreb: Školska knjiga; 2016.
- [16] Skoog DA, West DM, Holler FJ. Osnove analitičke kemije. Zagreb: Školska knjiga; 1999.
- [17] Flow injection analysis [Internet; pristupljeno 20.9.2017.]. Dostupno na: <http://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%202.0%20Sequential%20Injection.html>
- [18] Harvey D. Modern Analytical Chemistry. USA: The McGraw-Hill Companies. 2000.
- [19] Chromedia [slika s Interneta; pristupljeno 6.10.2017.]. Dostupno na: <http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=fotjtbEsHiemBpdmBIIecCAtB&subNav=lnijabEsHiemBpdmBIIecCAtBN>

- [20] Carlroth [slika s Interneta; pristupljeno 1.10.2017]. Dostupno na: https://www.carlroth.com/en/en/Labware/Measuring-Instruments/pH-meters---desktop-pH-meters/Benchtop-pH-ion-meters-SevenCompact%3Csup%3ETM-%3C-sup%3ES220/Benchtop-pH-ion-meter-SevenCompact%3Csup%3ETM%3C-sup%3ES220%2C-pH-Meter-SevenCompact%3Csup%3ETM-%3C-sup%3ES220-U-Kit-Version/p/0000000200038de900040023_en
- [21] Pipette supplies^{INC} [slika s Interneta; pristupljeno 1.10.2017.]. Dostupno na: <https://www.pipettesupplies.com/store/pipettes/single-channel-mechanical/nichipet-premium-nichiryo/>
- [22] European Pharmacopoeia 6th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2008: Vol 1.
- [23] Cas ChemNet.com [slika s Interneta; pristupljeno 5.10.2017.]. Dostupno na: <http://www.chemnet.com/cas/en/14875-91-3/copper-neocuproine-complex.html>
- [24] European Pharmacopoeia 6th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2008: Vol 2.

8. Sažetak

U ovom je radu optimizirana i vrednovana metoda određivanja glutaciona slijednom analizom injektiranjem uz spektrofotometrijski detektor. Metoda se temelji na redoks-reakciji između bakar(II)-neokuproin kompleksa i glutaciona (GSH). Glutacion ima ulogu reducensa te kao produkti nastaju oksidirani oblik glutaciona (GSSG) i bakar(I)-neokuproin kompleks koji postiže apsorpcijski maksimum pri $\lambda = 458$ nm. Optimizacijom parametara protočnog sustava obuhvaćeni su redosljed injektiranja reagensa i uzorka, brzina protoka osnovne otopine, volumeni injektiranja analita i uzorka, duljina reakcijske uzvojnice te volumen petlje zadržavanja. Tako optimiziranom metodom ostvareno je linearno dinamičko područje (LDP) u koncentracijskom rasponu od $6,00 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ do $8,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ uz pripadajuću jednadžbu pravca $y = 3270 x - 0,0010$ i koeficijent linearne regresije $R^2 = 0,9983$. Izmjerene su vrijednosti poslužile kao temelj za računanje granice dokazivanja (LOD = $2,20 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹) i granice određivanja (LOQ = $6,00 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹). U određivanju analita predloženom metodom interferirali su: limunska kiselina, vinska kiselina, acetilsalicilna kiselina te natrijev citrat. Temeljem 15 uzastopnih injektiranja standardne otopine uzorka utvrđena je ponovljivost metode uz relativno standardno odstupanje, RSD = 3,80 %. Mjerenjem smjesa otopina realnog uzorka i standardne otopine glutaciona različitih koncentracija vrednovana je točnost metode. Uspoređeni su rezultati određivanja glutaciona u realnom uzorku predloženom metodom i metodom preporučenom farmakopejom. Slaganje rezultata (52,00 mg i 50,86 mg) upućuje na točnost metode.

Ključne riječi: slijedna analiza injektiranjem, glutacion, spektrofotometrija

9. Summary

A method for determination of glutathione using sequential injection analysis had been optimized and validated. The method is based on a redox reaction between glutathione and Cu(II)-neocuproine complex where glutathione is a reductant. Products of reaction are oxidised form of glutathione (GSSG) and Cu(I)-neocuproine complex which reaches its absorption maximum at $\lambda = 458 \text{ nm}$. Optimized parameters of flow system include sequence of injection of sample and reagent, rate of flow of carrier solution, volumes of injection of sample and reagent, volume of holding coil and length of reaction coil. Optimized method parameters were used to plot the calibration curve. The following equation had been determined: $y = 3270 x - 0,0010$. Linearity is achieved at analyte concentrations ranging from $6,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ to $8,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Limit of detection is $\text{LOD} = 2,20 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ while the limit of quantification is $6,00 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Following compounds interfere: acetylsalicylic acid, tartaric acid, citric acid and sodium citrate. Repetability was confirmed based on results of 15 sequential injections of standard solution of glutathione. Relative standard deviation was 3,80 %. Method accuracy was validated by determining concentrations of mixed solutions composed of glutathione standard solution and glutathione real sample solution. Results of the developed method were compared with results of pharmacopoeial method. Similar results (52,00 g and 50,86 g) indicate method accuracy.

Keywords: sequential injection analysis, glutathione, spectrophotometry

Ante Rogošić rođen je 23. kolovoza 1993. u Splitu (Republika Hrvatska). 2008. godine završio je osnovnu školu „Plokite“ u Splitu, a 2012. godine opću gimnaziju „Marko Marulić“ u Splitu. Od 2012. do 2017. studira na studiju Farmacije na Kemijsko-tehnološkom fakultetu i Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu. Od ožujka do rujna 2017. obavljao je stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije koje je obuhvaćalo rad u javnoj ljekarni (ljekarnička jedinica Lučac), galenskom i analitičkom laboratoriju te bolničkoj ljekarni. U rujnu 2017. polaže završni stručni ispit.

Od 2013. aktivno sudjeluje u humanitarnim i javnozdravstvenim projektima Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske te u organizaciji 3. kongresa Udruge. Kao član organizacijskog odbora Natjecanja u kliničkim vještinama dobio je Rektorovu nagradu za akademsku godinu 2015./2016.

U rujnu 2016. obavlja praksu na Sveučilištu Algarve (Universidade do Algarve, Faro, Portugal) u sklopu programa razmjene studenata (eng. *Student exchange programme*, SEP) međunarodne udruge studenata farmacije. U srpnju 2017. sudjeluje na ljetnoj školi europske udruge studenata farmacije (EPSA *Summer university*) u Covilhi (Portugal), a u kolovozu iste godine je član organizacijskog tima Plivine ljetne škole kliničke farmacije u Splitu.